

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
19. Februar 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/014540 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: B01J 13/02,  
13/22

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008376

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. Juli 2003 (29.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 36 409.5 2. August 2002 (02.08.2002) DE  
103 15 846.4 2. April 2003 (02.04.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): CAPSULATION NANOSCIENCE AG [DE/DE];  
Volmer Strasse 7b, 12489 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DAEHNE, Lars  
[DE/DE]; Stillerzeile 3, 12587 Berlin (DE). BAUDE,  
Barbara [DE/DE]; Schwielowsestr. 84c, 14548 Caputh  
(DE). VOIGT, Andreas [DE/DE]; Ahrenshooper Strasse  
67, 13051 Berlin (DE).

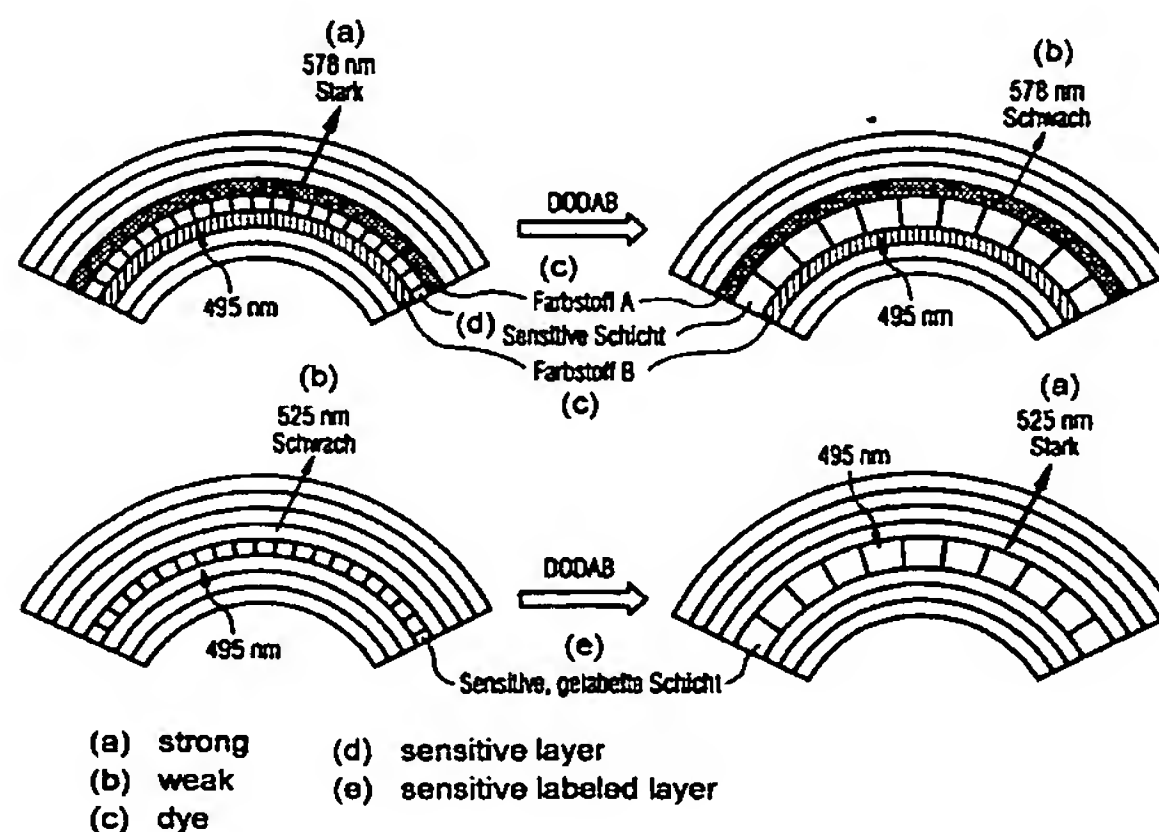
(74) Anwälte: GINZEL, Christian usw.; c/o Zimmermann &  
Partner, Postfach 330 920, 80069 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,  
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: COLOR COATED LAYER-BY-LAYER MICROCAPSULES SERVING AS COMBINATORY ANALYSIS  
LIBRARIES AND AS SPECIFIC OPTICAL SENSORS

(54) Bezeichnung: FARBKODIERTE LAYER-BY-LAYER MIKROKAPSELN ALS KOMBINATORISCHE ANALYSEBIBLIO-  
THEKEN UND ALS SPEZIFISCHE OPTISCHE SENSOREN



(57) Abstract: Monodisperse colloids were coated with polyelectrolytes by means of the layer-by-layer method. The template cores can remain inside or can be dissolved. Different fluorescent dyes are covalently bound in a defined amount to the polyelectrolytes. The amount of dye is controlled by varying the label content or by the Co deposition of unlabeled polymers. Different dye layers are separated from one another by intermediate layers thereby suppressing unwanted interactions. Conversely, a FRET signal can be generated between suitable dye pairs situated at short distances (0 - 6 nm) from one another. This signal can be controlled independent of the dye concentration by the number of intermediate layers. The capsule coding is read out by the variation in the excitation wavelength and emission wavelength. Macromolecules can be immobilized inside the capsules and extract complementary substances out of solutions. Particles coated in such a manner or hollow capsules can be used as sensors after inserting a sensitive intermediate layer. Changes in the size/structure of the intermediate layer can be detected either by FRET between adjacent, labeled polyelectrolyte layers or by the self-quenching/aggregate fluorescence of dyes in the sensitive layer.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/014540 A1



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(48) **Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten Fassung:** 8. April 2004

(15) **Informationen zur Berichtigung:**  
siehe PCT Gazette Nr. 15/2004 vom 8. April 2004, Section II

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(57) **Zusammenfassung:** Monodisperse Kolloide wurden mit Polyelektrolyten mittels des Layer-by-Layer Verfahrens beschichtet. Die Templatkerne können im Inneren verbleiben oder aufgelöst werden. An die Polyelektrolyten werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe in definierter Menge kovalent gebunden. Die Farbstoffmenge wird über Variation des Labelgehalts oder durch Co-Abscheidung ungelabelter Polymere kontrolliert. Unterschiedliche Farbstoffschichten werden durch Zwischenschichten voneinander getrennt, wodurch unerwünschte Wechselwirkungen unterdrückt werden. Umgekehrt kann zwischen geeigneten Farbstoffpaaren bei geringen Abständen (0 - 6 nm) ein FRET-Signal erzeugt werden, welches unabhängig von der Farbstoffkonzentration durch die Anzahl der Zwischenschichten kontrolliert werden kann. Die Kapselkodierung wird durch Variation der Anregungs- und Emissionswellenlänge ausgelesen. In den Kapseln können Makromoleküle immobilisiert werden, welche komplementäre Substanzen aus Lösungen herausfischen. Derart beschichtete Partikel oder hohle Kapseln können nach Einbringen einer sensitiven Zwischenschicht als Sensoren genutzt werden. Änderungen in der Grösse/Struktur der Zwischenschicht kann entweder durch FRET zwischen benachbarten, gelabelten Polyelektrolytschichten oder durch Selbstlöschung/Aggregatfluoreszenz von Farbstoffen in der sensitiven Schicht detektiert werden.

02 FEB 2005

**Farbkodierte Layer-by-Layer Mikrokapseln als kombinatorische Analysebibliotheken und als spezifische optische Sensoren**

5

**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft kombinatorische Bibliotheken auf der Basis von hohlen oder gefüllten Polyelektrolytkapseln, die mittels der Layer by Layer Methode hergestellten werden. Die LbL Methode ermöglicht die Kontrolle der Anzahl, der Konzentration und des Abstandes zwischen den Farbstoffmolekülen auf der Nanometerskala, wodurch sich eine höhere kodierte Informationsmenge in der Wand (Hülle) ergibt, als es von Partikeln (Beads, volle Mikropartikel) bekannt ist, die in ihrem Volumen oder an ihrer Oberfläche farblich kodiert sind. Weiterhin ist der Fluoreszenzfarbstoff vollständig an der Oberfläche konzentriert, was für FRET basierte Detektion in homogenen Partikelassays von Vorteil ist, da die hohe Untergrundfluoreszenz der im Inneren des Partikels lokalisierten und daher nicht am FRET beteiligten Farbstoffe vollständig wegfällt.<sup>13</sup> Der zweite Teil der Erfindung befasst sich mit der Möglichkeit, Kapseln mit unterschiedlichen Makromolekülen zu füllen, jedoch die Kapseln weiterhin permeabel für kleine Moleküle zu halten. Derartige farbkodierte Kapseln können als kombinatorische Fangbehälter verwendet werden, welche eine erhebliche Menge von spezifischen Substanzen aus einem Reaktionsgemisch aufnehmen können. Nachfolgend können die unterschiedlichen Kapseln mit unterschiedlichen Substanzen in ihrem Inneren aufgrund ihrer spezifischen Fluoreszenzsignale aussortiert werden. Diese kombinatorischen Bibliotheken können in vielen Gebieten in der Medizin, der Biologie und der Chemie angewendet werden.

Die Miniaturisierung von Assays und Mikrotiterplatten ist im Hinblick auf eine weitere Vergrößerung der Assayskapazität begrenzt. Eine alternative Methode eröffnen die auf Beads basierenden Bibliotheken. Neue Entwicklungen in der Flußzytometrie (Flow Cytometrie; z.B. COPAS™ bead flow sorting) erlauben einen Durchsatz von bis zu

100.000 Partikel pro Stunde. Daher könnten die auf Beads basierenden Bibliotheken die führende Technologie in Screening-oder Sammeloperationen werden.<sup>1-5,7</sup>

Wir haben hohle Kapseln aus Polyelektrolyten<sup>6</sup> hergestellt, welche unterschiedliche Farbkombinationen in ihrer Wand enthalten. Die farbkodierten Kapseln können wie Beads sortiert werden, jedoch sind sie hohl und können viele Bindungsstellen sowohl auf der Wandoberfläche als auch in ihrem Inneren aufweisen.

Diese Kapseln haben im Vergleich zu der Beads-Technologie verschiedene Vorteile:

- 10        1. Ihrer Masse ist sehr gering. Daher fallen Sie aus Lösungen mit unterschiedlicher Dichte wesentlich langsamer als Beads aus.
- 15        2. Infolge ihrer dünnen Wand und dem gleichen oder ähnlichem Material im Inneren wie im Äußeren ist die Lichtstreuung sehr klein. Bei Beads führen Unterschiede im Brechungsindex zwischen Bead und dem Lösungsmittel (gewöhnlich Wasser) zu starker Lichtstreuung, die den Sortierprozeß im Flußzytometer beeinträchtigt.
- 20        3. Reaktionen sind bei Beads nur an deren Oberfläche möglich. Daher ist die Anzahl ihrer Bindungsstellen stark begrenzt. Im Falle unserer Kapseln können die äußere Wandoberfläche, die innere Wandoberfläche und das gesamte Volumen der Kapseln für Reaktionen genutzt werden. Eine Kapseln (oder ein Bead) mit einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  hat eine äußere Oberfläche von 78  $\mu\text{m}^2$  und ein Volumen von 65  $\mu\text{m}^3$ . Unter Annahme einer Konzentration der Bindungsstellen von 0.1 M weist ein Bead lediglich etwa  $9 \times 10^4$  Bindungsstellen auf, wohingegen eine Kapseln etwa 5000 mal mehr Bindungsstellen, nämlich  $4 \times 10^8$  Bindungsstellen aufweist.
- 25        4. Die Farbstoffmarkierungen können mit ausreichendem Abstand untereinander aufgebracht werden, um Wechselwirkungen wie die Bildung von H- oder J-Aggregaten, Selbstlöschung oder Förster-Resonanzenergietransfer zu vermeiden, welche die Fluoreszenzsignale im Falle der Markierung der Festkörperphase mit unterschiedlichen Farbstoffen stören. Dies gestattet mehr kombinatorische Möglichkeiten.
- 30



5. Förster-Resonanzenergietransfersignale können kontrolliert zur fälschungssichere Kodierung von Handelsmarken eingestellt werden, d.h. zur Markierung der mit der Handelsmarke versehenen Ware.

5

6. Der Innenraum der Kapseln kann mit hochaktiven Biowirkstoffen wie Enzyme, DNS oder dergleichen oder mit spezifisch funktionalisierten Polyelektrolyten gefüllt werden, welche ein selektives Fangen von Reaktionspartnern aus der Lösung durch Bioreaktionen, Physi- oder Chemisorption ermöglichen. Nachfolgend können die kodierte Kapseln aussortiert werden.

10

7. Die kodierte Information kann durch die Anzahl der Farbstoffen, ihr Verhältnis untereinander und durch abstandsabhängige Wechselwirkungen untereinander wie etwa dem Förster Resonanzenergietransfer eingestellt werden. Bei den bekannten fluoreszierenden Beads<sup>4</sup> sind solche Wechselwirkungen unerwünscht, da der Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen nicht kontrollierbar ist.

15

8. Herstellung von hohlen kodierten Kapseln und Nutzung ihres Innenraums für die Immobilisierung von Makromolekülen (Polyelektrolyte, Proteine, Enzyme). Die funktionalisierten Makromoleküle können komplementäre Verbindungen aus Reaktionslösungen durch Physisorption, Chemisorption biologische Bindungen herausfischen.

20

Die vorliegende Erfindung betrifft Sensoren, die mittels der Layer-by-Layer LbL Methode auf Kolloiden mit Durchmessern kleiner als 100 µm aufgebaut werden und auf chemische Stoffe oder physikalische Meßgrößen ansprechen. Das kolloide Templat kann gegebenenfalls in einem Folgeschritt herausgelöst werden, so dass hohle Kapseln entstehen.

25

30 Die Sensorwirkung wird durch eine Schicht definierter Dicke eines speziellen Materials erreicht, dass bei Änderung der Konzentration eines Stoffes in der umgebenden Lösung oder bei der Veränderung physikalischer Parameter entweder quillt oder schrumpft. Zur

Detektion dieses Prozesses wird die Emission von Fluoreszenzfarbstoffen verwendet. Zwei Varianten der Wirkungsweise sind möglich (Abbildung 8):

1. Die sensitive Schicht mit einer Dicke zwischen 0,1 nm und 10 nm befindet sich zwischen zwei Schichten aus Polyelektrolyten. Die Polyelektrolytschicht auf der einen Seite der sensitiven Schicht enthält fest eingebunden einen Fluoreszenzfarbstoff höherer Absorptionsenergie (Donor) und die Polyelektrolytschicht auf der anderen Seite einen Fluoreszenzfarbstoff niedrigerer Absorptionsenergie (Akzeptor). Statt Fluoreszenzfarbstoffen können auch emittierende Nanopartikel verwendet werden. Das Farbstoffpaar ist so abgestimmt, dass ein Förster (Fluoreszenz-) Resonanzenergietransfer FRET stattfindet. Die Effizienz des FRET hängt empfindlich von dem Abstand der Farbstoffmoleküle zueinander ab. Das FRET Signal kann spektrometrisch sowohl anhand der Donor- als auch der Akzeptorfluoreszenz statisch sowie anhand der Donorfluoreszenz auch zeitabhängig detektiert werden.
2. Das sensitive Material wird kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff in vergleichsweise hoher Konzentration (Masse Material: Masse Farbstoff < 500:1) verknüpft. Der Farbstoff zeichnet sich dadurch aus, dass er leicht mit sich selbst Dimere/Aggregate bildet. Wird das gelabelte Material in einer Kapselwand als mindestens eine homogene Schicht mit einer Dicke von 1 nm bis 1 µm eingebracht, führt ein Selfquenchingprozeß bei der Bildung von Dimeren oder H-aggregaten zu einer Löschung der Fluoreszenz des Farbstoffmonomeren, wohingegen bei Bildung von J-Aggregaten oder Excimeren eine neue Emissionsbande bei niedrigerer Energie entsteht. Bei Quellung/Schrumpfung der Schicht in der Kapselwand kann das Signal über die Intensität oder die Lebensdauer der Monomerfluoreszenz detektiert werden, bzw. über das Verhältnis von Monomerfluoreszenz zur Fluoreszenz des J-Aggregates bzw. Excimeren.

Im allgemeinen weisen die erfindungsgemäßen Kapseln, die bevorzugt einen Durchmesser kleiner als 100 µm haben, eine Hülle auf, die aus mindestens drei Polyelektrolytschichten aufgebaut ist, wobei eine der drei Polyelektrolytschichten mit zumindest einem Farbstoff markiert ist. Dieser Farbstoff, bei dem es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff oder emittierende (fluoreszierende) Nanopartikel (Partikel mit einer Größe bevorzugt kleiner 1 nm) handeln kann, dient beispielsweise zur Identifizierung der Kap-

seln. In diesem Fall werden die Kapseln zur Markierung bzw. Codierung von technischen Erzeugnissen, Partikeln, Zellen, Gewebe, Organen oder Organismen biologischen Ursprungs verwendet, so daß anhand der Fluoreszenz des Farbstoffes deren Herkunft festgestellt und identifiziert werden kann. Andererseits können die Kapseln auch als Sensoren dienen, die auf veränderte Umgebungsbedingungen mit Änderung der Fluoreszenz des Farbstoffs meßbar reagieren. Schließlich können die Kapseln auch als 'Fangbehälter' verwendet werden, um Substanzen aus Lösungen zu entfernen bzw. zu identifizieren. Kapseln, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind und spezifisch mit jeweils einer anderen Substanz reagieren, beispielsweise durch spezifische Bindungsstellen, eignen sich als Bibliothek von Reporter-Partikel zur Identifikation von Substanzen und/oder der Markierung von Prozessen. Es liegt im Rahmen der Erfindung, diese Anwendungen miteinander zu kombinieren.

Unter Polyelektrolyten werden im Rahmen der Erfindung insbesondere wasserlösliche Moleküle oder Aggregate verstanden, die mindestens 2 Ladungen, bevorzugt sogar mindestens drei Ladungen tragen. Bei einer Vielzahl von Polyelektrolyten liegen sogar deutlich mehr Ladungen vor. Zu den Polyelektrolyten zählen im Rahmen der Erfindung insbesondere organische Polyelektrolyte, Nanopartikel, Polyampholyte sowie Verbindungen und Komplexe aus organischen Polyelektrolyten und niedermolekularen Substanzen, z.B. Tenside.

Bei den Polyelektrolytschichten handelt es sich insbesondere um Schichten, die im wesentlichen etwa eine Monolage des entsprechenden Polyelektrolyts dick sind. Solche Polyelektrolytschichten lassen sich z.B. durch Layer-by-Layer Verfahren aufbringen. Bei diesen werden Polyelektrolyte abwechselnder Polarität aufgebracht, wobei sich Polyelektrolyte solange an bestehende Polyelektrolytschichten anlagern, bis die Ladungen der bereits bestehenden Schicht abgesättigt sind.

Mehrschichtige Polyelektrolytkapseln, die auch aus unterschiedlichen Polyelektrolytschichten bestehen können, lassen sich beispielsweise nach dem Layer-by-Layer Verfahren herstellen, das in der DE 198 12 083 A1, DE 199 07 552 A1, EP 98 113 181, WO/47252 US 6,479,146 beschrieben ist, deren Offenbarungsinhalt hiermit vollständig aufgenommen wird.

Sofern die Kapseln als Sensor dienen, können beispielsweise zwei der drei Hüllschichten mit jeweils einem unterschiedlichen Farbstoff markiert werden. Die nicht mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte dritte Polyelektrolytschicht liegt dabei zwischen den beiden markierten Polyelektrolytschichten. Dadurch weisen diese einen gewissen Abstand zueinander auf, der etwa der Dicke, beispielsweise 0.1 nm bis 10 nm, der nicht markierten mittleren dritten Schicht entspricht. Die Dicke der Polyelektrolytschicht hängt dabei unter anderem von dem verwendeten Polyelektrolyt ab. Die verwendeten Farbstoffe sind so gewählt, daß sie unterschiedliche Emissions- und Absorptionsbanden aufweisen, wobei sich die Emissionsbande des einen Farbstoffs mit der Absorptionsbande des anderen Farbstoffs zumindest teilweise überlappt. Dadurch kann es zu strahlungslosen Übergängen zwischen den Farbstoffen kommen, d.h. zu einem FRET. Der Farbstoff mit der höheren Absorptionsenergie (Akzeptor) kann dadurch seine Anregung an den anderen Farbstoff (Farbstoff mit niedriger Absorptionsenergie; Donor) weitergeben, ohne daß eine Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffs beobachtet wird. Der strahlungslose Übergang führt damit zu einer Anregung des Donorfarbstoffs, dessen Fluoreszenz gemessen werden kann. Absorbiert der Akzeptorfarbstoff beispielsweise im Blauen und fluoresziert im Grünen, so sollte der Donorfarbstoff im Grünen absorbieren und beispielsweise im Roten emittieren. Eine Anregung mit blauem Licht führt dann bei einem strahlungslosen Übergang zwischen den Farbstoffen zu einer beobachtbaren Fluoreszenz im Roten, anstatt im Grünen. Die Effizienz des strahlungslosen Übergangs zwischen den Farbstoffmolekülen hängt stark von deren Abstand zueinander ab, der von der Dicke der nichtmarkierten dritten Polyelektrolytschicht bestimmt wird. Ändert sich diese Dicke, z.B. als Reaktion auf veränderte Umgebungsbedingungen, so ändert sich die Stärke der Kopplung zwischen den Farbstoffmolekülen. Daher kann auch von einer sensitiven Schicht (sensorischen Zwischenschicht) gesprochen werden. Ist der Abstand der Farbstoffmoleküle gering, erfolgt ein nahezu strahlungsloser Übergang, d.h. es ist nur eine geringe Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffs jedoch eine relative hohe Fluoreszenz des Donorfarbstoffs detektierbar. Bei Vergrößerung des Abstands nimmt die Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffs ab. Diese Änderungen sind meßbar und dienen als Maß für die Veränderung der Schichtdicke. Bei den Umgebungsbedingungen, deren Änderung zu einer Änderung der Schichtdicke der nichtmar-



- kierten Schicht führen, kann es sich um pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur, adsorbierte Komponenten, Enzyme, Konzentration eines Stoffes, physikalische Parameter, das Lösungsmittel beeinflussende oder mit der sensitiven Schicht reagierende Komponenten sowie mischbare Lösungsmittelanteile handeln. Insbesondere organische Polyelektrolyte reagieren empfindlich auf veränderte Umgebungsbedingungen. So führt beispielsweise eine Temperaturänderung zur Veränderung der Wasseraufnahmefähigkeit der organischen Polyelektrolyte und damit zu einer Schichtdickenänderung. Ein Beispiel ist hier PAH.
- 10 Neben der nichtmarkierten Polyelektrolytschicht können weitere Polyelektrolytschichten zwischen den mit Farbstoff markierten Polyelektrolytschichten angeordnet sein, oder die nichtmarkierte Polyelektrolytschicht besteht selbst aus mehreren Polyelektrolytschichten.
- 15 Sensorische Kapseln können jedoch auch lediglich mit einem Farbstoff markiert sein. In diesem Fall ist der Farbstoff in hoher Konzentration an sensitives Material innerhalb einer Polyelektrolytschicht gebunden, wobei das sensitive Material auf die veränderten Umgebungsbedingungen durch Volumenzu- oder -abnahme reagieren kann. Die hohe Konzentration der Farbstoffe führt zu einem Selfquenching, beispielsweise durch Dimerbildung, oder zur Ausbildung neuer Emissionsbanden im Falle der Bildung von Excimeren. Auch hier sind diese Prozesse stark von dem Abstand der Farbstoffe abhängig, so daß eine Änderung der Schichtdicke auch zu einer Änderung des Abstandes der Farbstoffe führt.
- 20
- 25 Sofern die Kapseln als 'Fangbehälter' dienen, weisen sie spezifische Bindungsstellen für die zu fangenden Moleküle auf. Die Bindungsstellen können sich im Inneren der Kapseln oder auf deren Hülle befinden. Kapseln mit unterschiedlichen Bindungsstellen können mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert werden, so daß eine nachfolgende Sortierung anhand der Fluoreszenz möglich ist. Dadurch können selektiv Substanzen, z.B. Proteine, aus Lösungen gewonnen werden.
- 30

## Beschreibung der Experimente

### Farbstoffmarkierung von Polyelektrolyten:

PAH wurde mit den Farbstoffderivaten Fluoreszeinisothiocyanat, Tetramethylrhodaminisothiocyanat und einem Derivat von CY5 markiert. Die Formeln sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Markierungsreaktionen wurde entsprechend allgemeiner Herangehensweise bei der Markierung von Proteinen durchgeführt. Anstelle eines Hydrogenkarbonatpuffers wurde NaOH für die Aktivierung von ca. 30% der PAH Gruppen verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde gegen Wasser dialysiert. Nach Zugabe von HCL zu der markierten PAH-Lösung zur Einstellung eines pH-Wertes von 4 – 5 wurde die Lösung lyophilisiert. Der Markierungsgehalt wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt und betrug für PAH-Fl 53:1, PAH-Rho 580:1, PAH-Cy5 500:1 (Verhältnis der PAH Einheiten : Anzahl der markierten Moleküle). Die Ausbeute der Markierung betrug ca. 80% für Fluoreszein, 20% für Rhodamine und 40% für Cy5. Jedes PAH wurde nur mit einem Farbstoff markiert, da ein gleichzeitiges Markieren einer PAH-Kette den Nachteil der Selbstlöschung oder des Förster Resonanz Energie Transfer in sich birgt.

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Farbstoffe sind in Abb. 2a und b gezeigt. Die Absorptionsmaxima der drei markierten PAH-Polymere wurden zu 495, 557 und 648 nm bestimmt. Die Fluoreszenzmaxima betragen 520, 582 und 665 nm, wobei die Absorptionswellenlänge für die Anregung verwendet wurde.

### Herstellung der Kapseln:

3 µm große Silicatemplate wurden mit 10 alternierenden Schichten von Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH, MW 60 000 g/mol) und Poly(styrolsulfonat) (PSS, MW 70 000 g/mol) beschichtet.<sup>9</sup> Um unterscheidbare Wände zu erhalten, wurden unterschiedlich markierte PAH-Polymere für die Beschichtung verwendet. Für die Färbung der Kapseln wurde lediglich eine Schicht des jeweiligen PAH verwendet. Nur im Falle von Cy5 wurden aufgrund der geringeren Fluoreszenzquantenausbeute und des geringen Farbstoffgehalts 2 Schichten zur Markierung verwendet. Es wurde versucht, einen gewissen Abstand zwischen den unterschiedlichen Farbstoffschichten zur Vermeidung von Förster-Resonanzenergietransfer einzuhalten. Folgende Kapseln wurden hergestellt:

| Schicht/Kapsel | 1.  | 2.   | 3.   | 4.  | 5.   | 6.  | 7.   | 8. |
|----------------|-----|------|------|-----|------|-----|------|----|
| 1. PAH         | -   | -    | -    | -   | -    | -   | -    | -  |
| 2. PSS         | -   | -    | -    | -   | -    | -   | -    | -  |
| 3. PAH         | -   | -    | -    | Cy5 | Cy5  | Cy5 | Cy5  | -  |
| 4. PSS         | -   | -    | -    | -   | -    | -   | -    | -  |
| 5. PAH         | Rho | Rho  | Fluo | Cy5 | Cy5  | Cy5 | Cy5  | -  |
| 6. PSS         | -   | -    | -    | -   | -    | -   | -    | -  |
| 7. PAH         | -   | -    | -    | -   | Fluo | Rho | Fluo | -  |
| 8. PSS         | -   | -    | -    | -   | -    | -   | -    | -  |
| 9. PAH         | -   | Fluo | -    | -   | -    | -   | Rho  | -  |
| 10. PSS        | -   | -    | -    | -   | -    | -   | -    | -  |

**Tabelle 1:** Farbkodierte Kapseln mit unterschiedlichen Arten von PAH-Farbstoff  
5 Schichten

Hohle Kapseln wurde durch Auflösen des Silicatemplats mittels Fluorwasserstoffsäure und Waschen mittels Wasser gewonnen.

- 10 Die Kapseln wurden mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie unter gleichzeitiger Verwendung von 3 unterschiedlichen Kanälen untersucht (Abb. 3a – c). Die Anregungswellenlänge der Laser war 488 nm für Fluoreszein, 543 nm für Rhodamin und 633 nm für Cy5. Die Detektoren wurden auf maximale Emission der Farbstoffe und auf einen minimalen Überlapp ihrer Fluoreszenzemission eingestellt. Die Laserintensitäten  
15 und die Detektorempfindlichkeiten wurden auf etwa gleiche Signalintensität für jeden Kanal eingestellt. Die Überlagerung der 3 Kanäle ergab 7 verschieden gefärbte Kapseln (Abb. 3d).

Eine quantitative und sichere Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Kapseln  
20 bietet die Analyse der Fluoreszenzintensitäten entlang eines Profils durch die Kapseln. Die Profile zeigen die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von unterschiedlichen

Kanälen der gleichen Kapsel. Abbildung 4a zeigt zum Beispiel das Profil der Kapseln 2, 7, 1 und 5.

Die Fluoreszenzintensitäten pro Farbstoffschicht sind unterschiedlich für unterschiedlich gefärbte Kapseln, was auf Resonanzenergieeffekte und unterschiedlichem Gehalt an adsorbiertem Material zurückgeführt werden kann. Der Resonanzenergietransfer kann bei Verwendung mehrerer Schichten zwischen den Farbstoffschichten deutlich reduziert werden. Oberhalb eines Abstands von 6 nm (ca. 4 Schichten) treten nahezu keine Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmolekülen mehr auf.

10

#### **Kontrollierter Förster-Resonanzenergietransfer**

Um feste Abstände zwischen den Farbstoffmolekülen zum Schutz von Handelsmarken gegen eine Fälschung zu verwenden, wurden Kapseln mit unterschiedlichem Abstand der Farbstoffe aber gleichem Farbstoffgehalt hergestellt. Abbildung 5 zeigt die hergestellten Schichtkombinationen.

15

Die in den Kapseln mittels zwei Farbstoffen kodierte Information kann unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen und Fluoreszenzmessung bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen ermittelt werden. Im Falle des Rhodamin/Fluoreszein-Systems bedeutet dies:

20

1. Anregungslicht bei 540 nm, Messung der Emission bei 576 nm: dies ergibt die absolute Konzentration von Rhodamin
- 25 2. Anregungslicht bei 495 nm, Messung der Emission bei 520 nm: dies ergibt die Konzentration von Fluoreszein abzüglich der Konzentration der Moleküle, die einen Energietransfer zu Rhodamin erfahren
- 30 3. Anregungslicht bei 495 nm, Messung der Emission bei 576 nm: dies ergibt die Intensität des FRET oder den mittleren Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen (Fälschungsnachweis)



Jede der hergestellten Kapselarten ergibt ein spezifisches Verhältnis zwischen Signal 1 : Signal 2 : Signal 3. Für die Messung von kleinen Unterschieden in der Signalintensität genügen bereits diese zwei Farbstoffe, um eine große Anzahl von Kodierungsmöglichkeiten zu realisieren. Jedoch kann die Anzahl der Farbstoffe in Kapseln bis zu 7 betragen.

#### **Nutzung des Förster-Resonanzenergietransfers für sensorische Anwendungen**

Für die Sensoranwendungen wurden die Kapseln 2 und 3 aus Tabelle 1 verwendet. Es wurde von uns gefunden, dass PAH/PSS Schichten bei Zugabe von Lösungen quaternärer Alkylammoniumsalze je nach Kettenlänge stark aufquellen oder auch schrumpfen. Ein starkes Quellen von (PAH/PSS)<sub>5</sub> Kapseln von 3 µm bis auf 5,7-6,0 µm wird bei Zugabe einer 0,05 M Dodecyltrimethylammomiumbromidlösung (DODAB) gefunden. Bei Verdoppelung des Kapseldurchmessers wird sich bei isotroper Quellung der Schichten der Abstand zwischen den Farbstoffschichten ebenfalls verdoppeln, wohingegen sich das Volumen einer Schicht um den Faktor 8 vergrößert.

Im Experiment 1 wurde die Kapsel 2 verwendet. Die Konzentration an Rhodamin und Fluoreszein in der Kapselwand wurde UV/VIS spektroskopisch vor und nach dem Quellungsvorgang bestimmt. Der mittlere Abstand zwischen beiden Farbstoffschichten betrug vor der Behandlung etwa 4,5 nm und danach nahezu 9 nm. Die Änderung des FRET Signals ( $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$ ) wurde mit dem Fluoreszenzspektrometer während des Quellvorgangs verfolgt (Abbildung 9). Durch die Quellung der Schichten verringerte sich die FRET Signalintensität bei Reaktion mit 0,05 M DODAB um 86%.

Im Experiment 2 wurde die Kapselsorte 3 verwendet. Durch die hohe Fluoreszeinkonzentration in der einen PAH Schicht tritt ein effizienter Quenchprozeß auf. Nach Zugabe von 0,05 M DODAB Lösung vergrößert sich das Volumen der PAH Schicht etwa um den Faktor 8. Durch die verringerte Selbstlöschung des Farbstoffes erhöht sich dadurch die Fluoreszenz der Kapseln um 290 % (Abbildung 10).

#### **Füllen der Kapseln mit reaktiven Makromolekülen:**

Es gibt drei unterschiedliche Wege für die Immobilisierung von Makromolekülen im Inneren der Kapseln:

1. "Schiff in Flasche" Synthese (ship in bottle synthesis) von Polymeren innerhalb der Kapseln (Abbildung 6).<sup>12</sup>
- 5 2. Schalten der Permeabilität von spezifischen Kapseln für korrespondierende Makromoleküle mittels Salze oder pH-Änderungen (Abbildung 7)<sup>11</sup>
3. Bilden eines Niederschlags eines instabilen Komplexen aus den Makromolekülen und einer Hilfssubstanz auf dem kolloiden Templat. Nachfolgendes Einkapseln des Materials durch die übliche LbL-Methode und Auflösen des Kerns und des  
10 Makromolekülkomplexes.<sup>8</sup>

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Kapseln sowie deren Verwendung sind nachfolgend angeführt, wobei sämtliche Ausgestaltungen beliebig  
15 miteinander kombinierbar sind:

- Kapseln aus Polyelektrolyt-Multischichten hergestellt nach dem Layer-by-Layer Verfahren und kleiner als 100 µm für Kodierungs- und sensorische/diagnostische/analytische Anwendungen und enthaltend  
20
  - a) eine definierte Zuordnung von farbstoffmarkierten Polyelektrolyten zur Schichtzahl,
  - b) eine definierte Zuordnung von farbstofffreien Polyelektrolyten zur Schichtzahl,
  - 25 c) eine definierte Zuordnung von sensorischen Polyelektrolyten oder sensorisch reaktiven Beschichtungskomponenten zur Schichtzahl
  - d) eine definierte Zuordnung von Wechselwirkungen der Markierungen unterschiedlicher Schichten
- 30 • Kapseln mit Kern oder ohne Kern als Hülle enthaltend das Lösungsmittel oder eine Lösung anderer Zusammensetzung.

- Kapseln enthaltend einen oder mehrere Fluoreszenzfarbstoffe in mindestens zwei Schichten, die es gestatten, sowohl die Fluoreszenzfarben als auch deren Intensitäten und die Wechselwirkungen bzw. Selbstwechselwirkungen definiert einzustellen.
- 5 • Kapseln enthaltend mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffe in unterschiedlichen Schichten, die miteinander über Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) verknüpft sind.
- 10 • Kapseln mit mindestens einer, zwischen zum FRET befähigten Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Schichten gelegenen sensorischen Zwischenschicht, die in Anpassung an veränderte Eigenschaften des Mediums, z.B. pH, Salzkonzentration, Temperatur, adsorbierte Komponenten, Enzyme, das Lösungsmittel beeinflussende oder mit der Zwischenschicht reagierende Komponenten sowie mischbare Lösungsmittelanteile, das FRET Signal messbar beeinflusst und für diese  
15 Änderung als Sensor dienen kann.
- Kapseln enthaltend mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffe, deren Abstand voneinander den Förster Resonanz Energie Transfer unterbindet.
- 20 • Kapseln mindestens eine Schicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff in einer Dichte, die zur Selbstwechselwirkung (Selbstlöschung) innerhalb der Schicht führen kann und durch Änderungen von Komponenten oder Bedingungen des Mediums oder der Umgebung messbar beeinflusst werden kann und dafür als Sensor dienen kann.
- 25 • Kapseln, wobei die Kapseln kleiner als 10µm, bevorzugt kleiner als 1µm sind.
- Kapseln mit einem modifizierten Kern, der sensorische Funktionen oder Kodierungseigenschaften besitzen kann.
- 30 • Verwendung der Kapseln als Bibliothek von Reporter-Partikeln oder kodierten Farbpartikeln zur Identifikation von Substanzen und/ oder der Markierung von Prozessen.

- Verwendung der Kapseln in der medizinischen Diagnostik, der kombinatorischen Chemie, der Genomik und Proteomik, der Biologie und Biotechnologie und der Technik.
- 5    • Verwendung der Kapseln zur Codierung von technischen Erzeugnissen.
- Verwendung der Kapseln zur Markierung von Partikel, Zellen, Geweben, Organen und Organismen biologischen Ursprungs.
- 10   • Zusammensetzung für die Identifizierung von Substanzen, wobei die Zusammensetzung mindestens zwei Arten von Kapseln mit einem Durchmesser weniger als 100  $\mu\text{m}$  aufweist, wobei die Kapseln einen Kern und eine Hülle besitzen und die Hülle mindestens drei Schichten aufweist, wobei zumindest eine dieser Schichten mit einem Farbstoff markiert ist.
- 15   • Zusammensetzung aufweisend zumindest 3 Arten von Kapseln.
- Zusammensetzung, wobei die Kapseln einen mittleren Durchmesser von weniger als 10  $\mu\text{m}$ , bevorzugt weniger als 1  $\mu\text{m}$  besitzen.
- 20   • Zusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüchen, wobei die Hüllen aus Polyelektrolytschichten bestehen.
- Zusammensetzung, wobei mindestens ein Kapseltyp durch Kapseln definiert ist, deren Hüllen aus mindestens zwei, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Schichten bestehen, wobei die mit unterschiedlichem Farbstoff markierten Schichten voneinander durch zumindest eine nicht mit Farbstoffen markierte Schicht getrennt sind.
- 25   • Zusammensetzung, wobei mindestens ein Kapseltyp durch Kapseln definiert ist, deren Hüllen aus mindestens zwei, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Schichten bestehen, wobei die mit unterschiedlichem Farbstoff markierten Schichten voneinander durch zumindest eine nicht mit Farbstoffen markierte Schicht getrennt sind.
- 30   Figuren 1 bis 10 zeigen verschiedene Ausführungsformen der Erfindung.

Figur 1 zeigt die Struktur der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.



Figur 2a) zeigt das Absorptionsspektrum (normalisierte Intensität) und Figur 2b) das Fluoreszenzspektrum (normalisierte Intensität) von PAH-Fl, PAH-Rho und PAH-Cy5, normalisierte Intensität.

- 5 In Figur 3 sind konfokale Bilder einer Mischung von farbkodierten Kapseln dargestellt. 3 a) zeigt den Fluoreszeinkanal, d.h. die Fluoreszenz von Fluoreszein, 3 b) den Rhodaminkanal, 3 c) den Cy5 Kanal und 3 d) die Überlagerung der drei Farbkanäle.

- 10 Figur 4 zeigt einer Mischung der gefärbten Kapseln 2, 7, 1, 5. Für die Aufnahmen wurde ein konfokales Fluoreszenzmikroskop verwendet. In Fig. 4 a) ist das Überlagerungsbild der drei Farbkanäle des Fluoreszenzmikroskops und in 4 b) das Profil der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie in Fig. 4 a) zu sehen.

- 15 Figur 5 verdeutlicht den prinzipiellen Aufbau der hergestellten Schichtkombinationen, wobei in Fig. a-c) unterschiedliche FRET-Signalintensitäten bei gleicher Farbstoffkonzentration und in Fig. 5 d-f) unterschiedliche FRET-Signalintensitäten bei unterschiedlicher Farbstoffkonzentration zu sehen sind, wobei a) links oben und f) rechts unten liegt.

- 20 In Figur 6 sind die prinzipiellen Schritte der sogenannten "Schiff in Flasche" Synthese von Polymeren innerhalb der Kapseln dargestellt. Nach der Auflösung des Kerns, der als Templat zur Beschichtung mit den Polyelektrolyten gedient hat, passieren Monomere die Hülle und gelangen in das Innere der Kapsel. Bei geeignet gewählten Bedingungen polymerisieren die Monomere und können daher die Hülle nicht mehr passieren. In  
25 einem abschließenden Waschschrift werden die Polymere außerhalb der Kapseln aus der Lösung entfernt. Zurück bleiben eingekapselte Monomere.

- Figur 7 zeigt das Prinzip des Beladens von MF Kapseln (8 Schichten) durch Schalten der Permeabilität von speziellen Kapseln für korrespondierende Makromoleküle durch  
30 Salz oder pH-Wert. Durch Änderung des Salzgehaltes und/oder des pH-Wertes können die Poren der Hüllen vergrößert und damit die Permeabilität erhöht werden. Dies erlaubt auch größeren Makromolekülen das Eindringen in die Kapseln. Abschließend wird der pH-Wert und/oder der Salzgehalt wieder auf die Anfangswerte zurückgeführt; die Poren

verschließen sich wieder bzw. werden kleiner. Die in die Kapseln eingedrungenen Makromoleküle können die Hülle nun nicht mehr passieren.

Figur 8 zeigt den schematischen Aufbau und die Wirkungsweise der zwei unterschiedli-  
5 chen, weiter oben beschriebenen Sensorkapseln. In der oberen Zeile in Figur 8 ist die Kapsel 2 dargestellt, während in der unteren Zeile die Kapsel 3 zu sehen ist. Durch Zugabe von DODAB vergrößert sich die Dicke der nicht markierten Zwischenschicht (sensitive Schicht), so daß der Abstand der beiden markierten Schichten zunimmt. Dadurch verringert sich die Kopplung zwischen den Farbstoffen, der FRET ist schwächer.  
10 Als Folge wird eine geringere Fluoreszenz des Donorfarbstoffs bei 578 nm registriert.

In Figur 9 sind die Signalintensitäten der Kapsel Nr. 2

- a) in Wasser und
- b) nach Einwirken einer 0,05 M DODAB Lösung dargestellt. (grün Absorption des  
15 Fluoreszeins bei 495 nm, rot –Absorption des Rhodamins bei 553 nm, blau FRET Signal  $\lambda_{exc} = 495$  nm,  $\lambda_{em} = 578$  nm)

Die Fluoreszenzintensität von Kapseln Nr. 3 nach Zugabe von 0,05 M DODAB ist dagegen in Figur 10 dargestellt.

**Literatur**

1. Battersby, Bronwyn Jean et. al. Patent WO 00/32542, Juni 2000
2. Payan, Donald US Patent 20010006787, A1, Juli 2001,
- 5 3. Still, et. al. US Patent 5,565,324, Oktober 1996; Still et.al., US Patent 6,001,579, März 1999
4. Norrman, Nils, Patent EP 1190256, März 2002
5. Trau, Mathias et.al. WO 99/24458, Mai 1999
6. Donath, E. et.al. WO 99/47252, März 1999
- 10 7. Spiro, A.; Lowe, M.; Brown, D. *Appl. Env. Microbiology* 66, 2000, 4258
8. Gaponik, N. Radtchenko, I.L.; Sukhorukov, G.B., Weller, H., Rogach, A.L. *Adv. Mater.* 14, 2002, 879
9. E. Donath, G.B. Sukhorukov, F. Caruso, S.A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 2002.
- 15 10. R. Steitz, V. Leiner, R. Siebrecht, R. v. Klitzing, *Colloids a. Surf. A*, 2000, 163, 63.
11. G. Ibarz, L. Dähne, E. Donath, H. Möhwald "Smart Micro- and Nanocontainers for Storage, Transport and Release" *Adv. Mater.* 13 (2001) 1324-1327.
12. L. Dähne, E. Donath, S. Leporatti, H. Möhwald, "Synthesis of micro reaction cages with defined chemical properties" *J. Amer. Chem. Soc.* 123 (2001), 5431-20 5436.
13. H. Härmä, "Particle technologies in diagnostics" TEKES Technology Review 126/2002

## Ansprüche

### 1. Kapseln

- mit einem Durchmesser kleiner als 100 µm und
- 5 - einer Hülle, die zumindest drei Polyelektrolytschichten aufweist, wobei zumindest eine dieser drei Polyelektrolytschichten mit zumindest einem Farbstoff markiert ist.

### 2. Kapseln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

- 10 zwei der drei Polyelektrolytschichten jeweils mit mindesten einem unterschiedlichen Farbstoff markiert sind, wobei die mit unterschiedlichem Farbstoff markierten zwei Polyelektrolytschichten voneinander durch zumindest die nicht mit Farbstoffen markierte dritte Polyelektrolytschicht getrennt sind.

### 3. Kapseln nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß

- 15 die nicht mit Farbstoffen markierte dritte Polyelektrolytschicht eine Dicke zwischen 0.1 nm und 10 nm aufweist.

### 4. Kapseln nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß

- 20 es sich bei der nicht mit Farbstoffen markierten dritten Polyelektrolytschicht um eine sensitive Schicht handelt, die bei Veränderung ihrer Umgebungsbedingungen entweder quillt oder schrumpft und so ihre Dicke ändert.

### 5. Kapseln nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß

- 25 es sich bei den Umgebungsbedingungen um pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur, adsorbierte Komponenten, Enzyme, Konzentration eines Stoffes, physikalische Parameter, das Lösungsmittel beeinflussende oder mit der sensitive Schicht reagierende Komponenten sowie mischbare Lösungsmittelanteile handelt.

### 6. Kapseln nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß

- 30 es sich bei den unterschiedlichen Farbstoffen um einen Farbstoff mit höherer Absorptionsenergie (Donor) und einen Farbstoff mit niedriger Absorptionsenergie (Akzeptor) handelt.



7. Kapseln nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die unterschiedlichen Farbstoffe so aufeinander abgestimmt sind, daß ein Förster (Fluoreszenz-) Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen den unterschiedlichen Farbstoffen möglich ist.
8. Kapseln nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sich zwischen denen mit Farbstoffen markierten Polyelektrolytschichten neben der nicht mit Farbstoffen markierten dritten Polyelektrolytschicht weitere nicht mit Farbstoffen markierte Polyelektrolytschichten befinden oder die nicht mit Farbstoffen markierte dritte Polyelektrolytschicht ihrerseits aus mehreren Polyelektrolytschichten besteht.
9. Kapseln nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der sensitive Schicht um eine organische Polyelektrolytschicht handelt.
10. Kapseln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff mit einem sensitiven Material kovalent in hoher Konzentration verknüpft wird.
11. Kapseln nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem sensitiven Material um ein Material handelt, das bei Veränderung seiner Umgebungsbedingungen entweder quillt oder schrumpft und so sein Volumen ändert.
12. Kapseln nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Umgebungsbedingungen um pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur, adsorbierte Komponenten, Enzyme, Konzentration eines Stoffes, physikalische Parameter, das Lösungsmittel beeinflussende oder mit dem sensitiven Material reagierende Komponenten sowie mischbare Lösungsmittelanteile handelt.
13. Kapseln nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Farbstoffs so hoch ist, daß der Farbstoff mit sich selbst Dimere, Aggregate oder Excimere ausbildet, die zu einem Selfquenching der Fluoreszenz oder zur Ausbildung einer neuen Emissionsbande führen.

14. Kapseln nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Farbstoffs der Beziehung  
Masse sensitiven Materials : Masse Farbstoff < 500 : 1  
5 genügt.
15. Kapseln nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Farbstoff markierte Schicht eine Dicke von 1 nm bis 1 µm aufweist.
- 10 16. Kapseln nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der mit Farbstoffen markierten Polyelektrolytschicht um eine mit Farbstoffen markierte organische Polyelektrolytschicht handelt.
- 15 17. Kapseln nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Farbstoffen um Fluoreszenzfarbstoffe oder emittierende Nanopartikel handelt.
- 20 18. Kapseln nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapseln hohl sind und sich in ihrem von der Hülle begrenzten Innenraum Makromoleküle befinden.
19. Kapseln nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Hülle für Moleküle bis zu einer gewissen Größe permeabel sind.
- 25 20. Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapseln einen festen Kern aufweisen, der von der Hülle umgeben ist.
- 30 21. Kapseln nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapseln einen mittleren Durchmesser von weniger als 10 µm, bevorzugt von weniger als 1 µm besitzen.
22. Kapseln nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapseln durch das Layer-by-Layer Verfahren hergestellt sind.

23. Kapseln nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapseln zur Markierung oder Codierung von technischen Erzeugnissen, Partikeln, Zellen, Gewebe, Organen oder Organismen biologischen Ursprungs dienen.

5

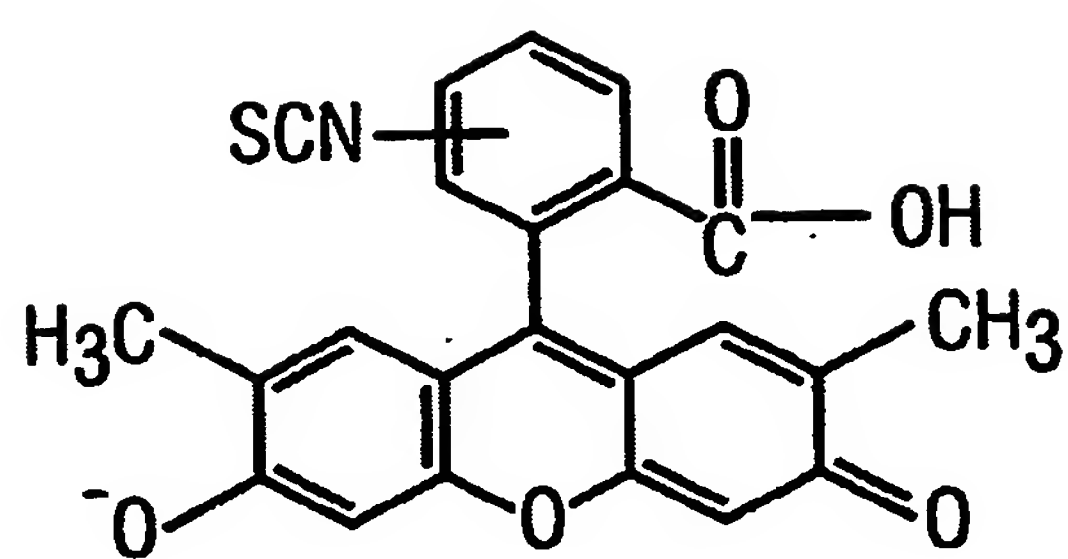
24. Zusammensetzung für die Identifizierung oder Markierung von Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens zwei Arten von unterschiedlichen Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 23 aufweist.

10

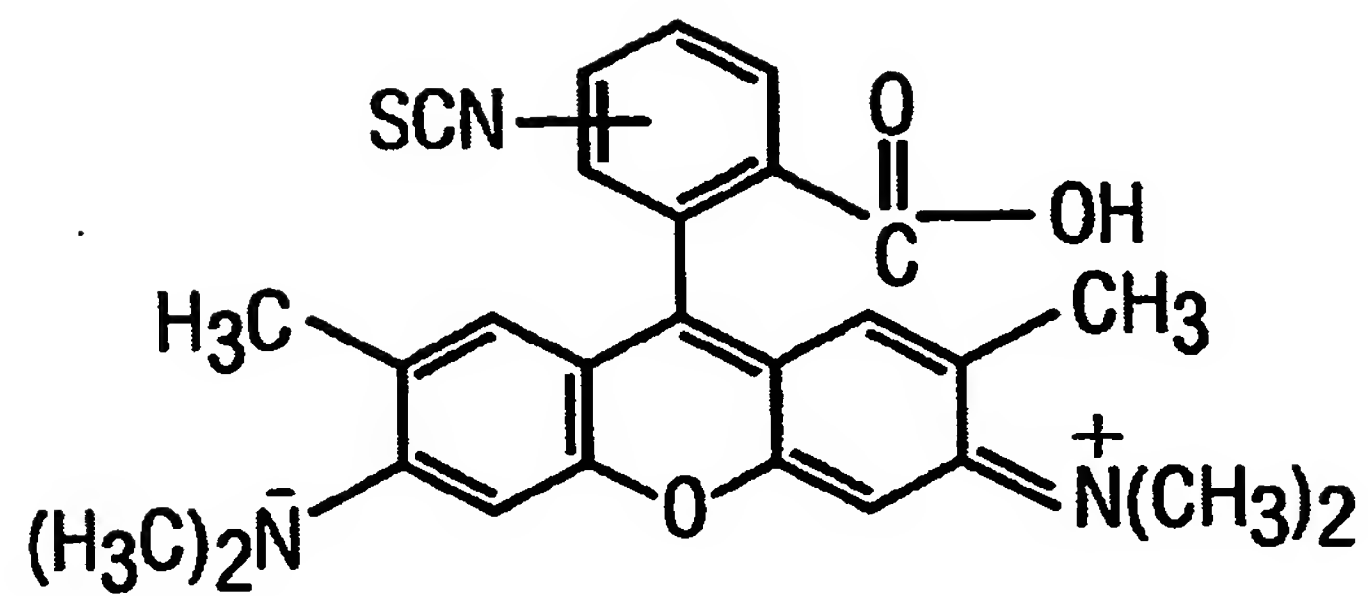
25. Zusammensetzung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest drei Arten von unterschiedlichen Kapseln nach einem der Ansprüche 1 bis 23 aufweist.

15

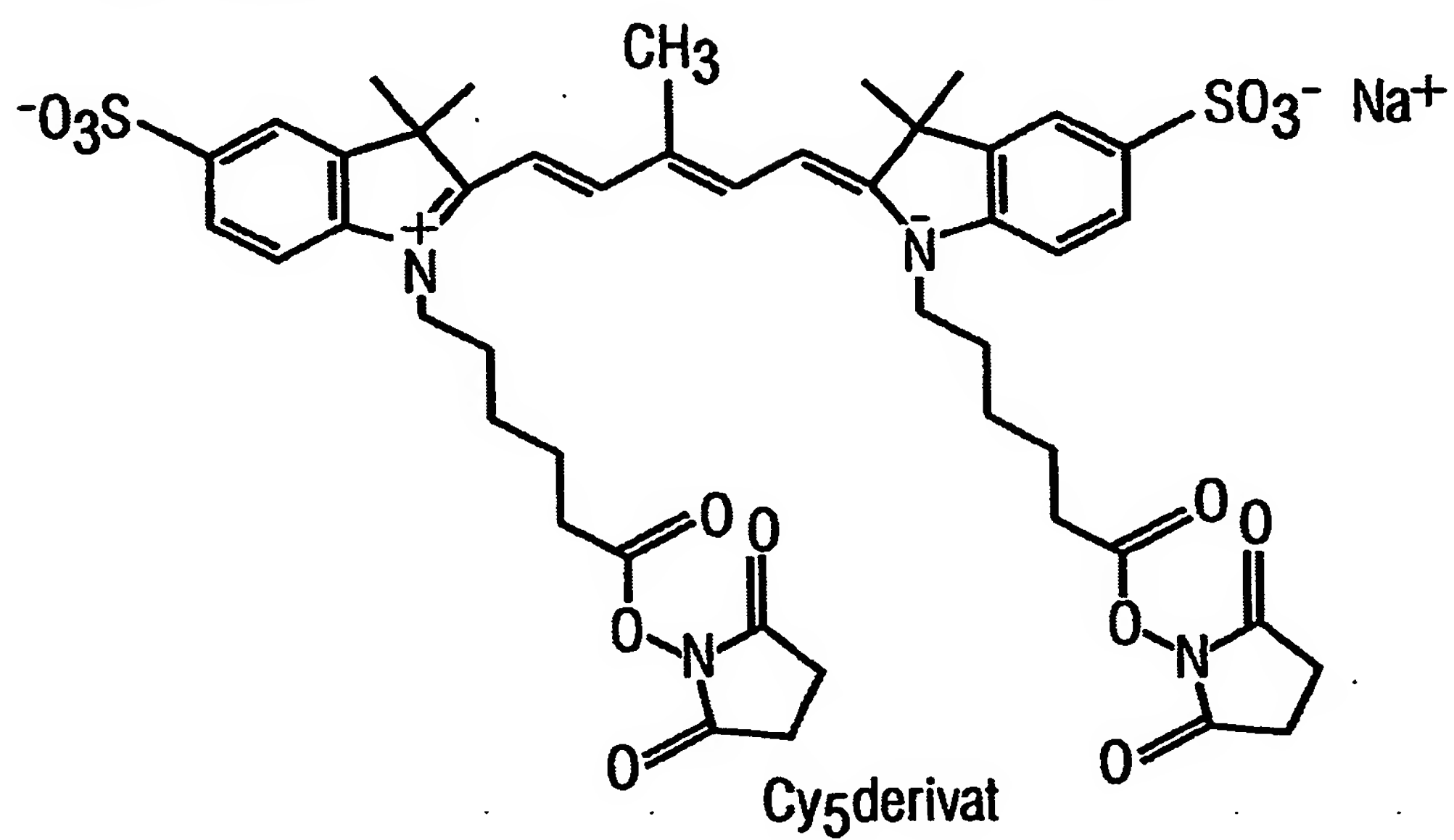
FIG 1



Fluoreszeinderivat



Rhodaminderivat



Cy5derivat



FIG 2A

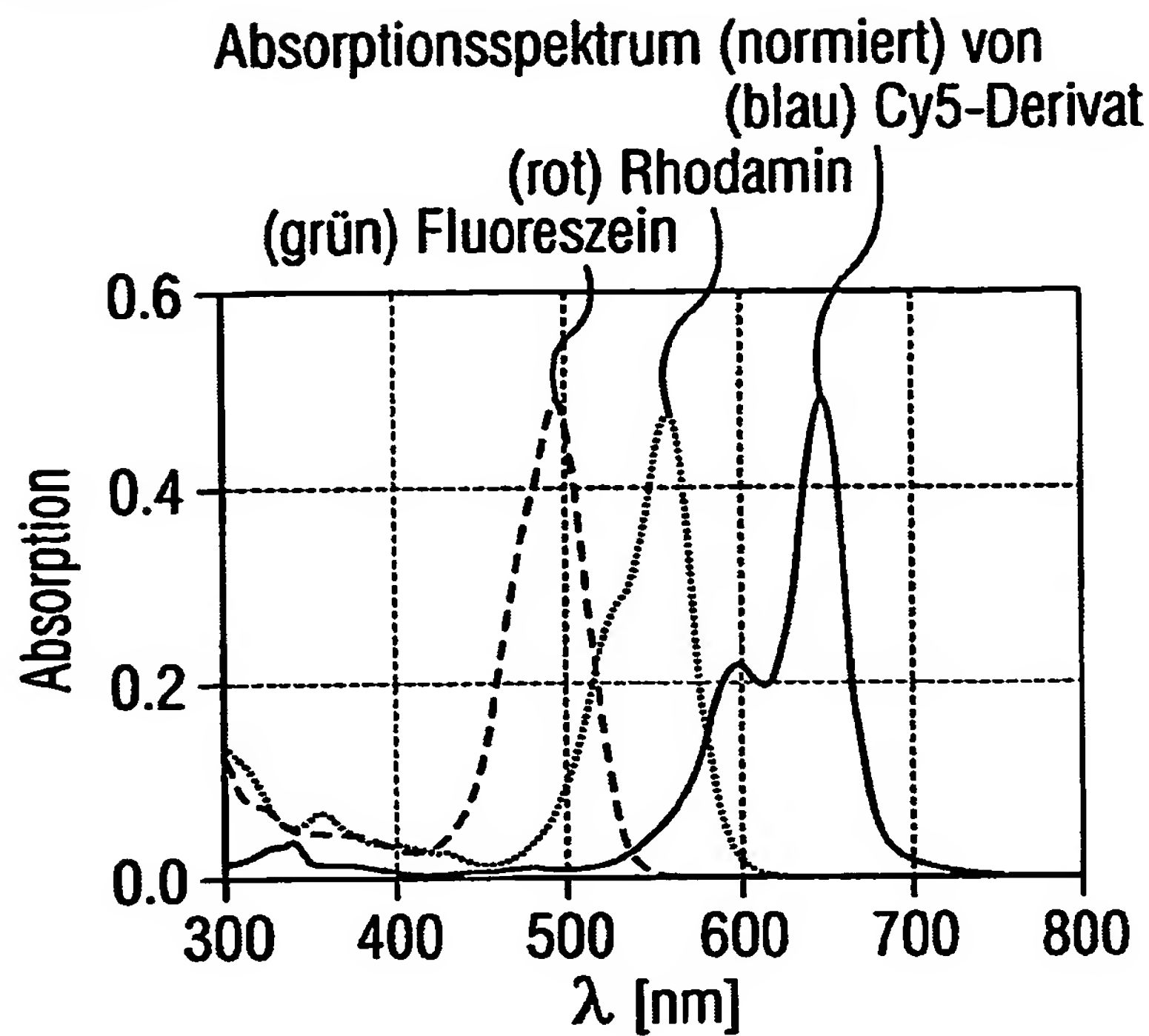


FIG 2B

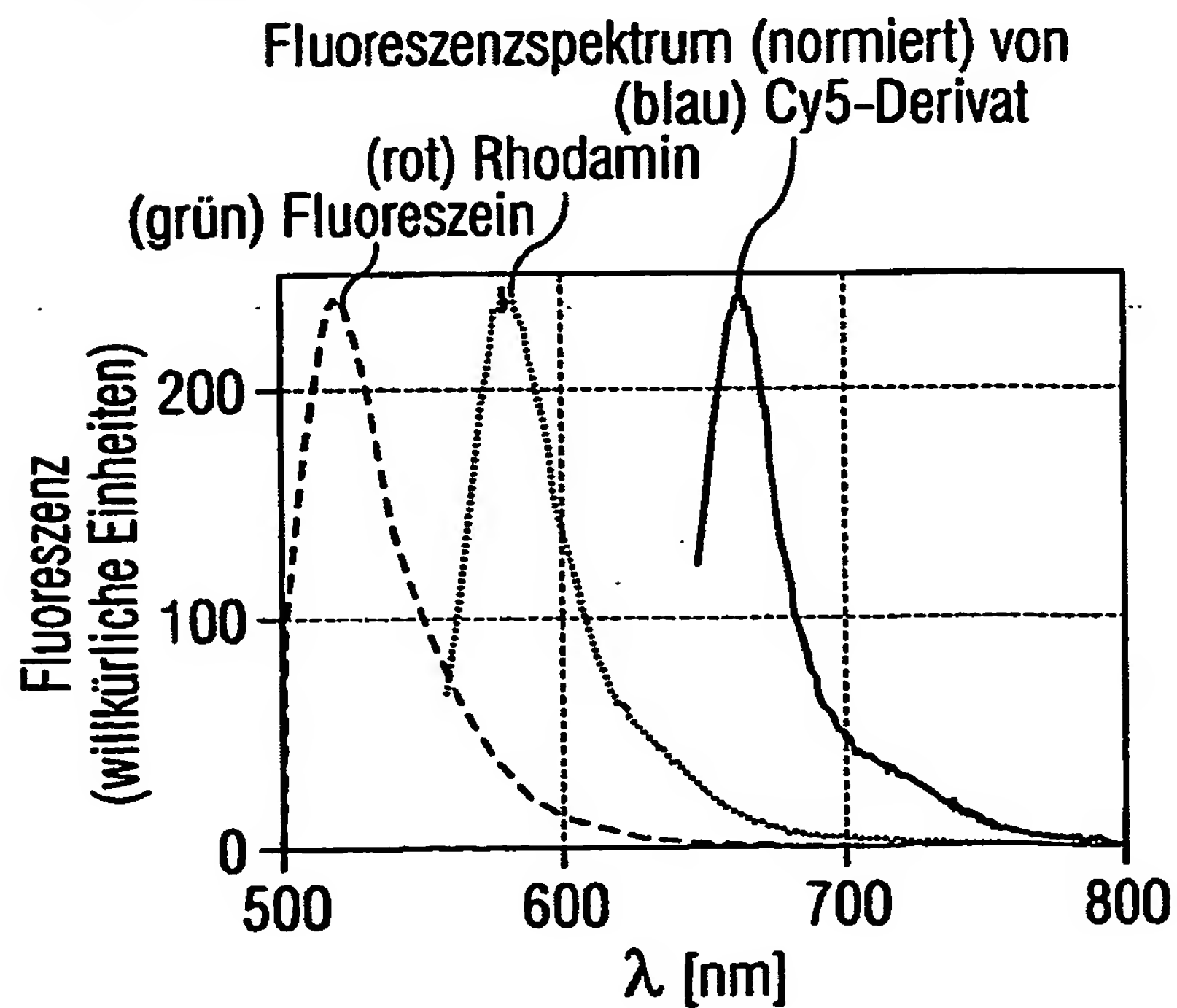
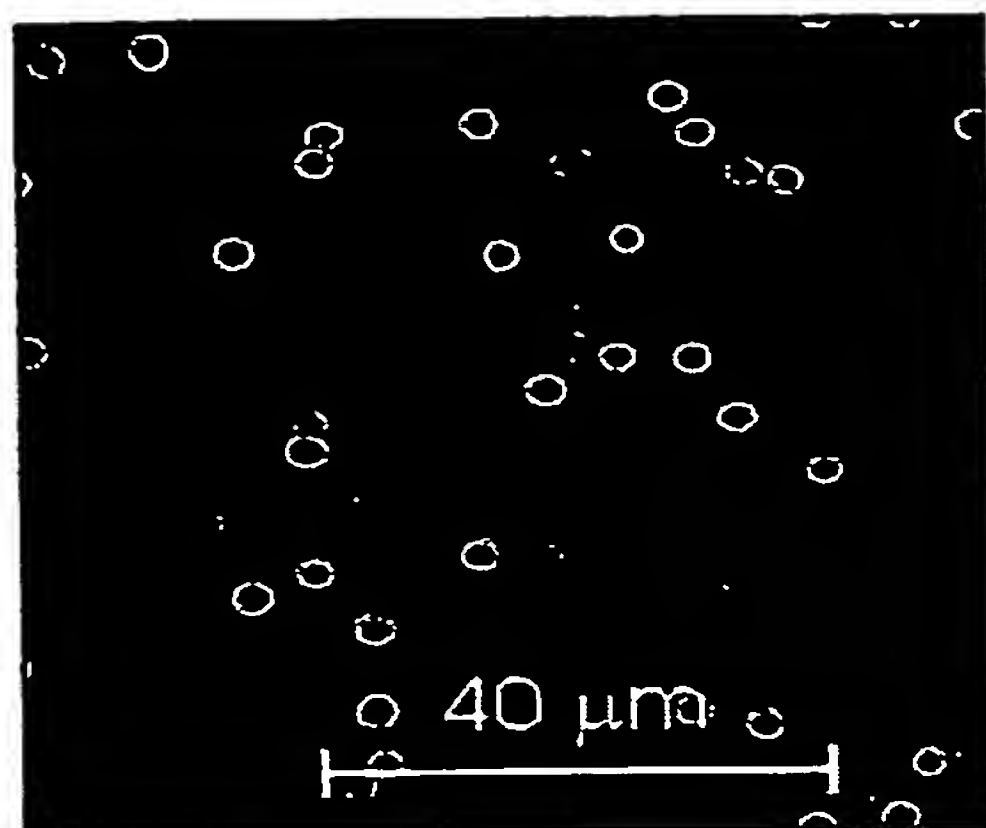
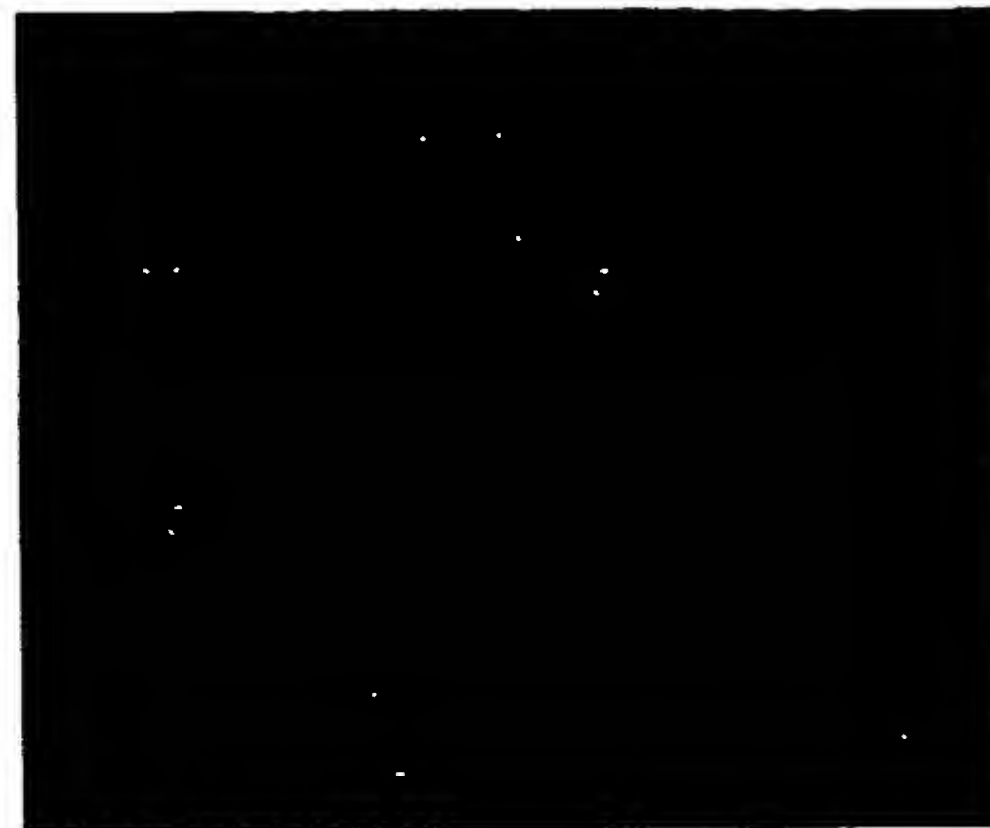


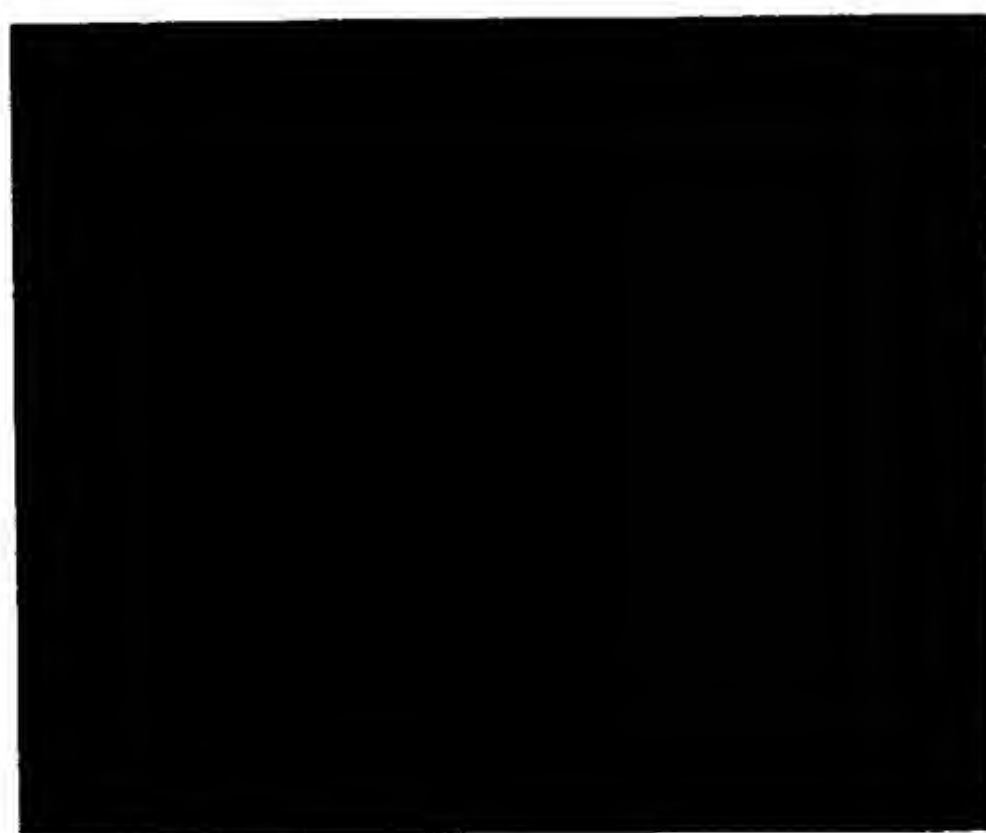
FIG 3



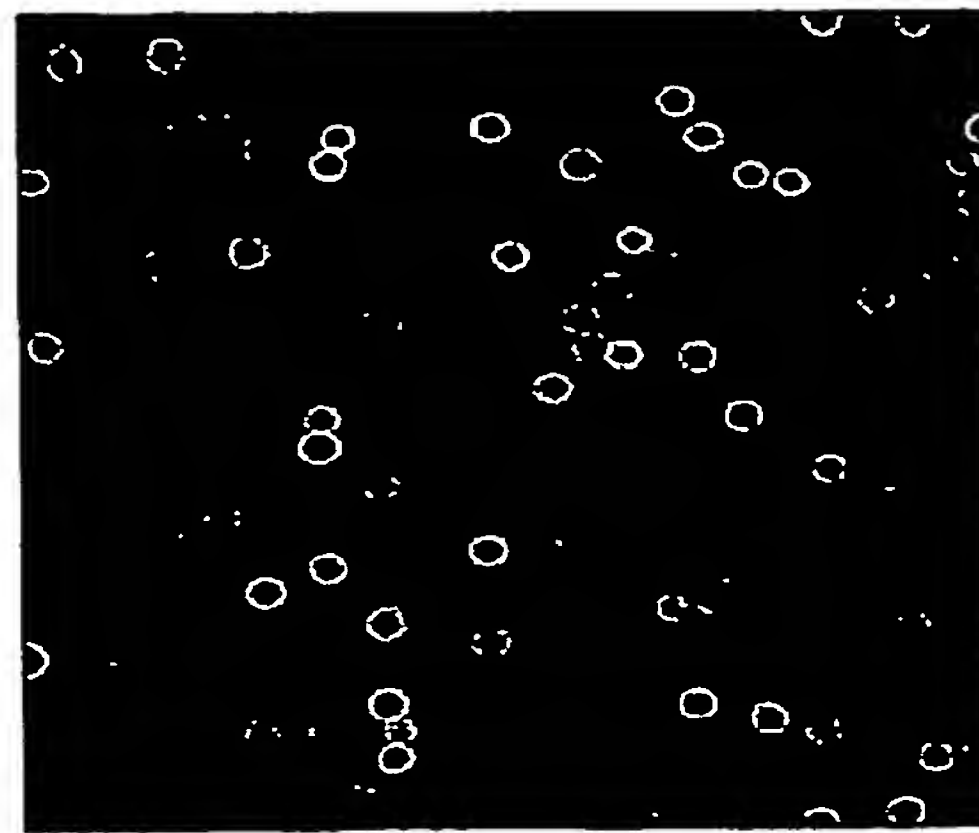
a)



b)



c)



d)

FIG 4A

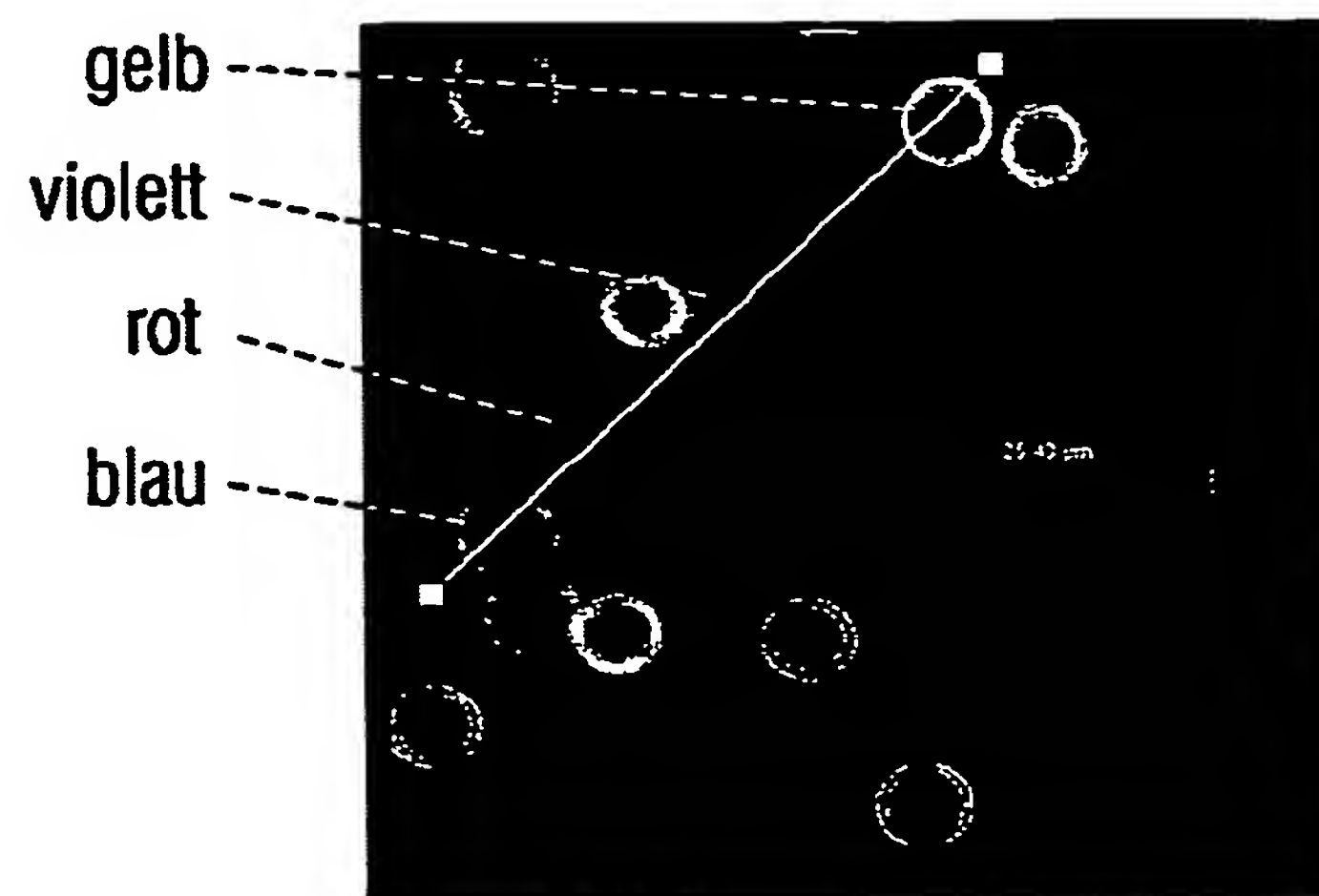


FIG 4B

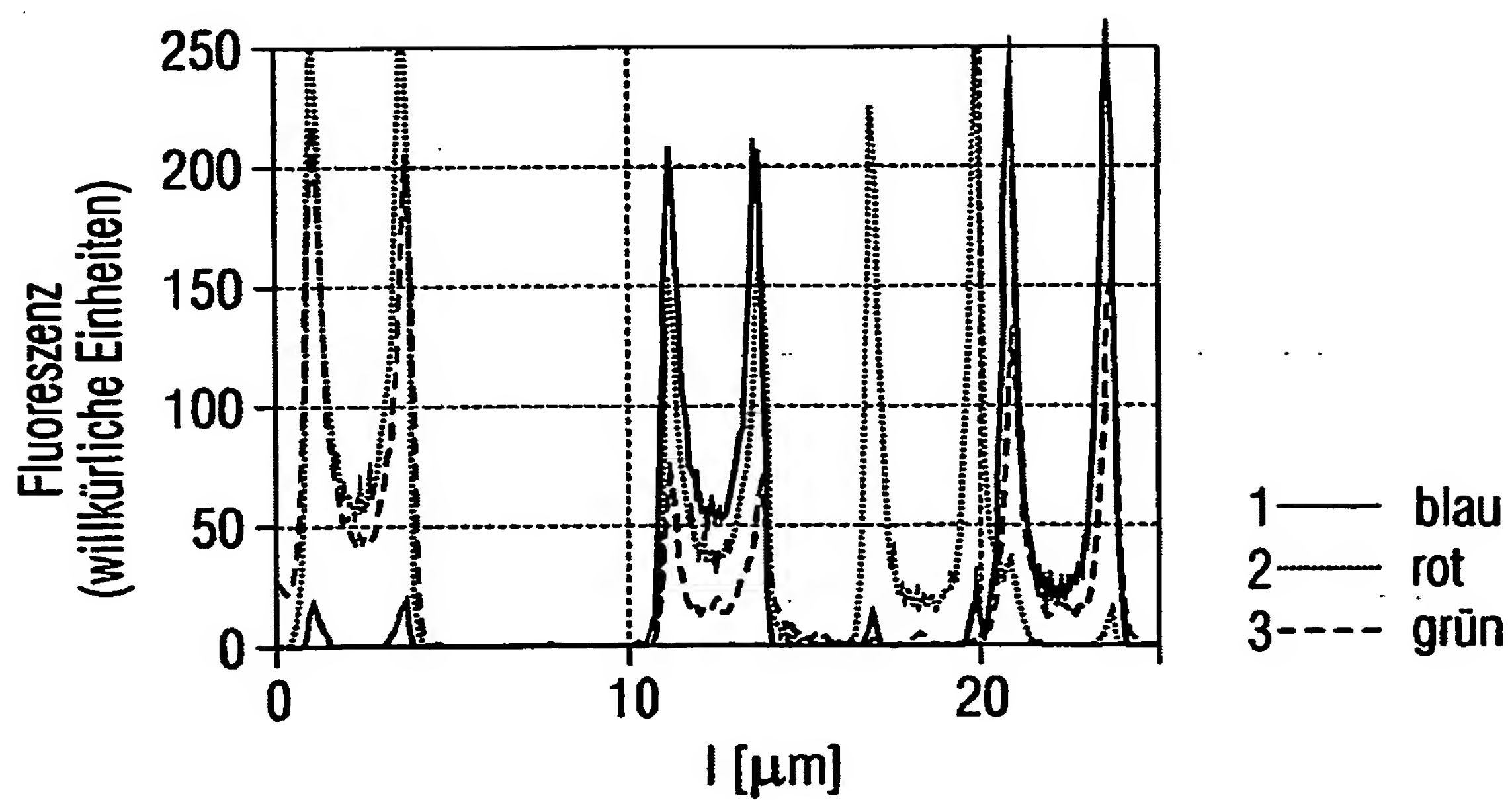
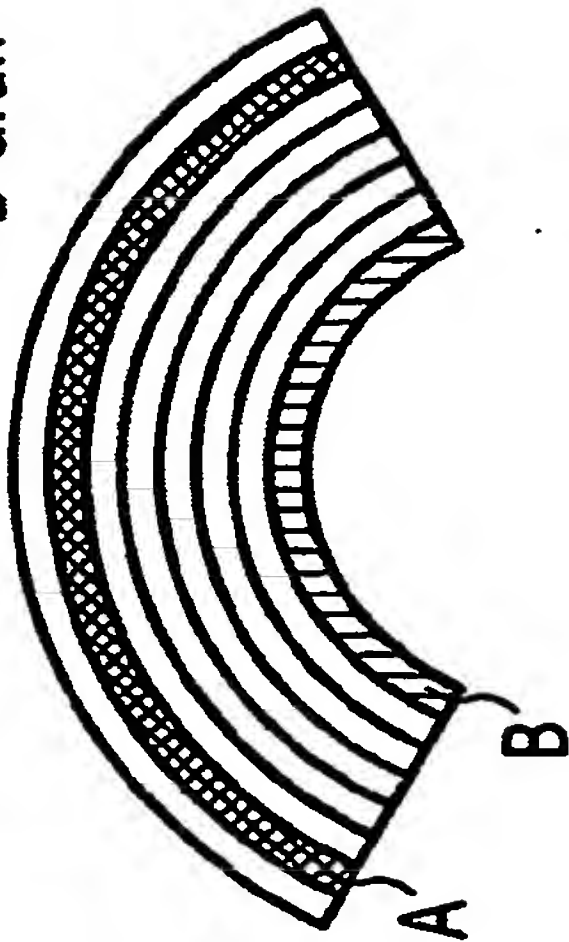
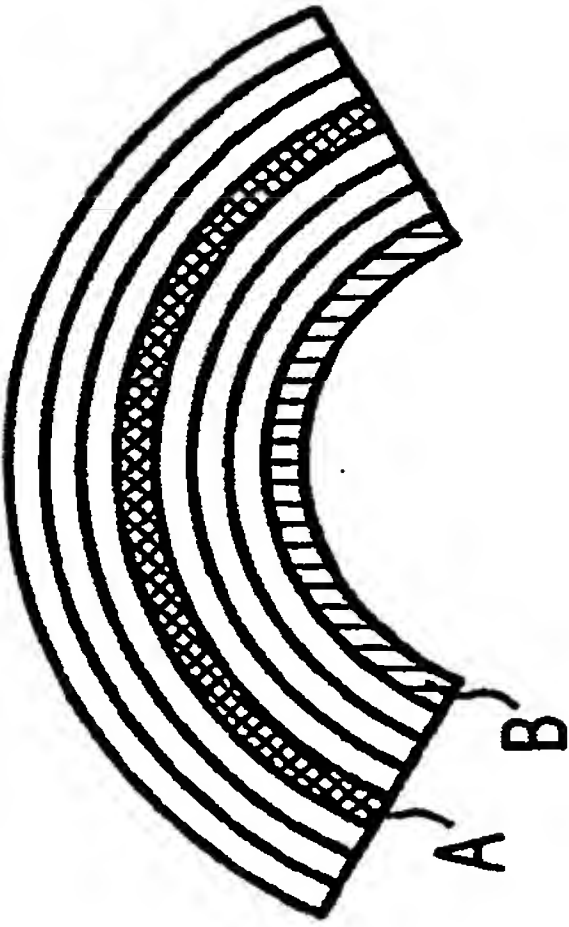


FIG 5

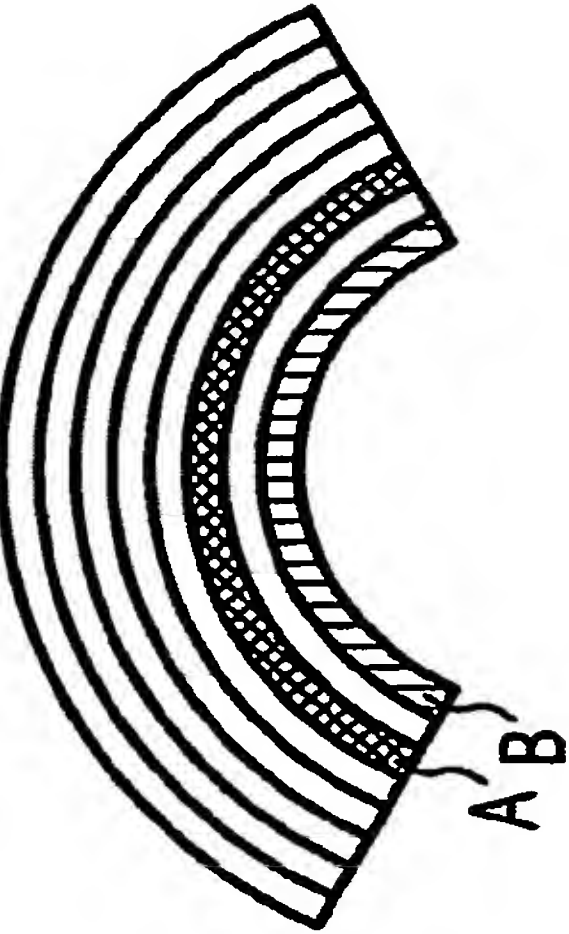
A Rot  
B Grün



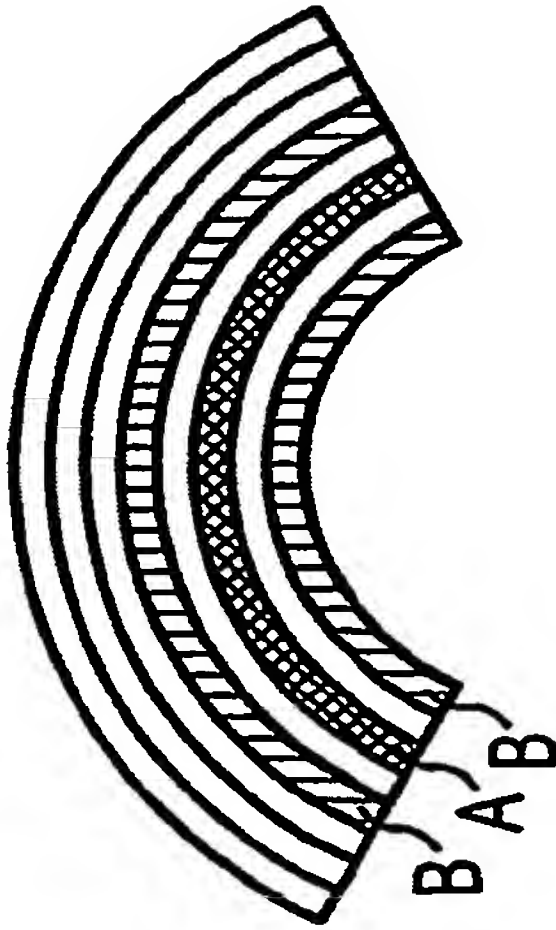
Signal 1 Konzentration Grün : 5  
Signal 2 Konzentration Gelb : 5  
Signal 3 FRET (Abstand Gelb/Grün) : 1



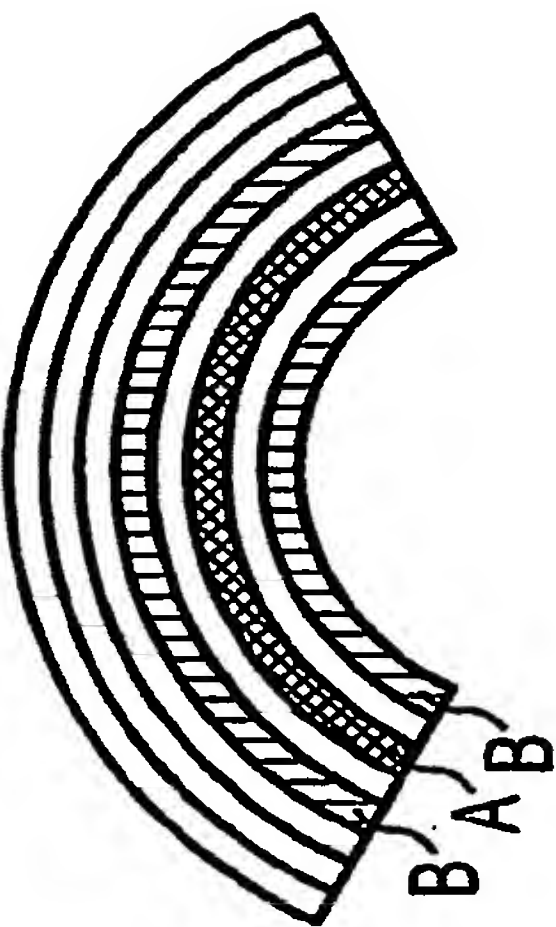
Signal 1 Konzentration Grün : 4  
Signal 2 Konzentration Gelb : 5  
Signal 3 FRET (Abstand Gelb/Grün) : 3



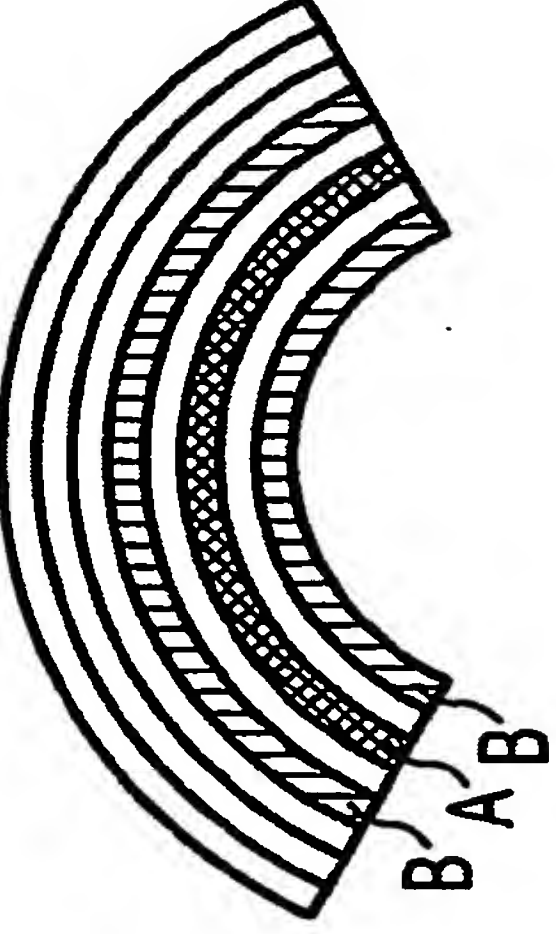
Signal 1 Konzentration Grün : 3  
Signal 2 Konzentration Gelb : 5  
Signal 3 FRET (Abstand Gelb/Grün) : 5



Signal 1 Konzentration Grün : 6  
Signal 2 Konzentration Gelb : 5  
Signal 3 FRET (Abstand Gelb/Grün) : 10

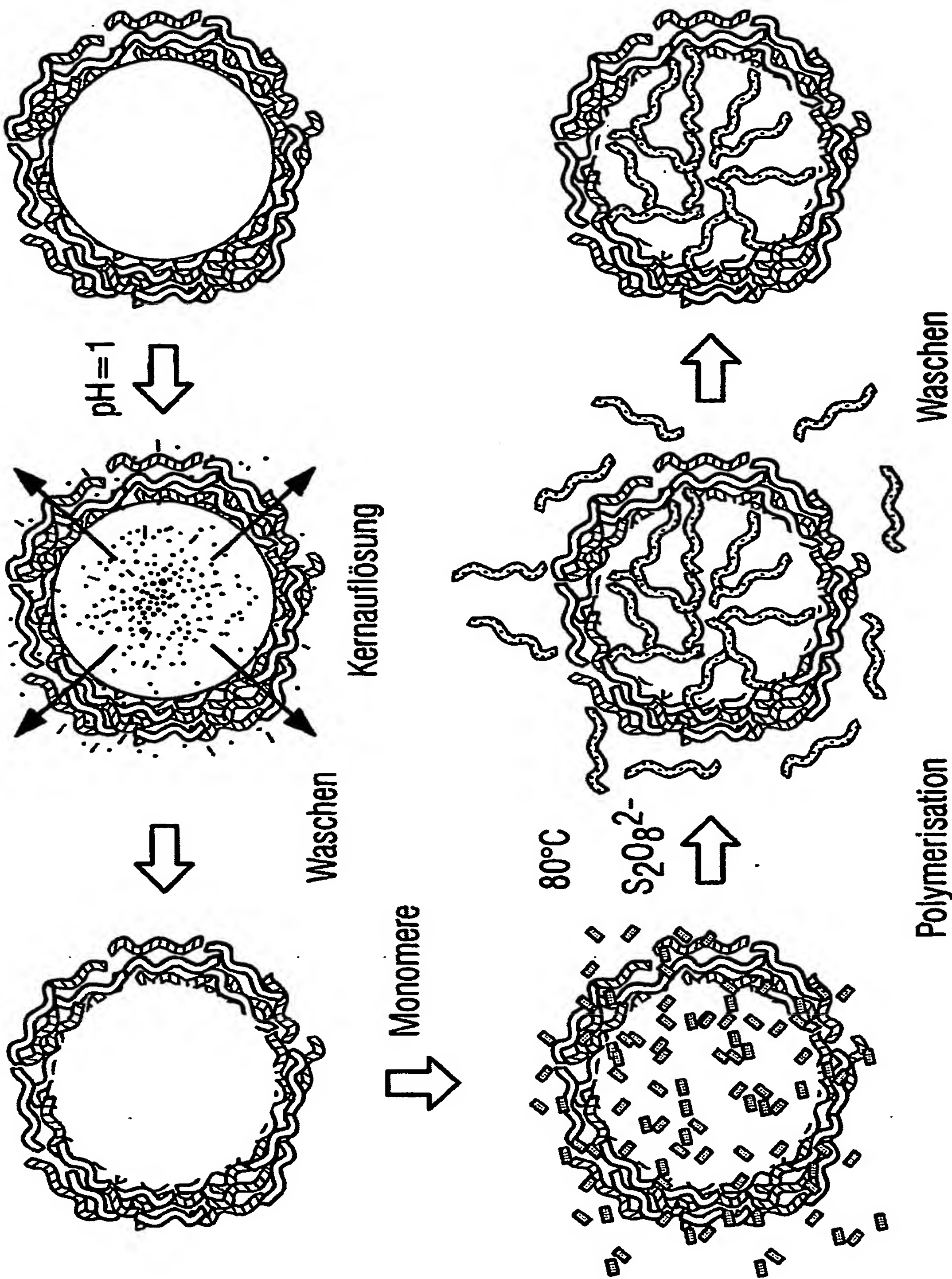


Signal 1 Konzentration Grün : 1  
Signal 2 Konzentration Gelb : 5  
Signal 3 FRET (Abstand Gelb/Grün) : 2,5

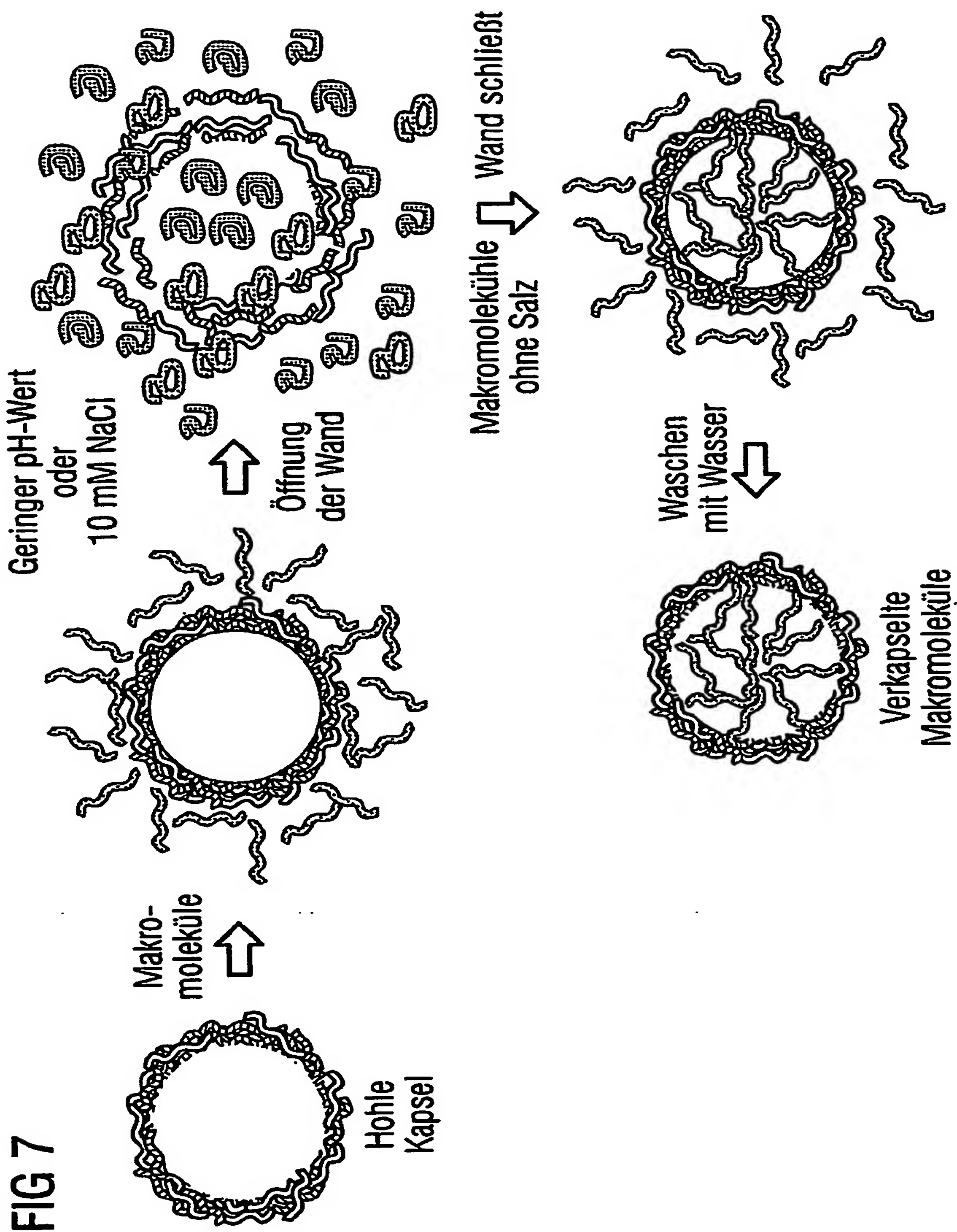


Signal 1 Konzentration Grün : 4  
Signal 2 Konzentration Gelb : 2  
Signal 3 FRET (Abstand Gelb/Grün) : 2,5

FIG 6







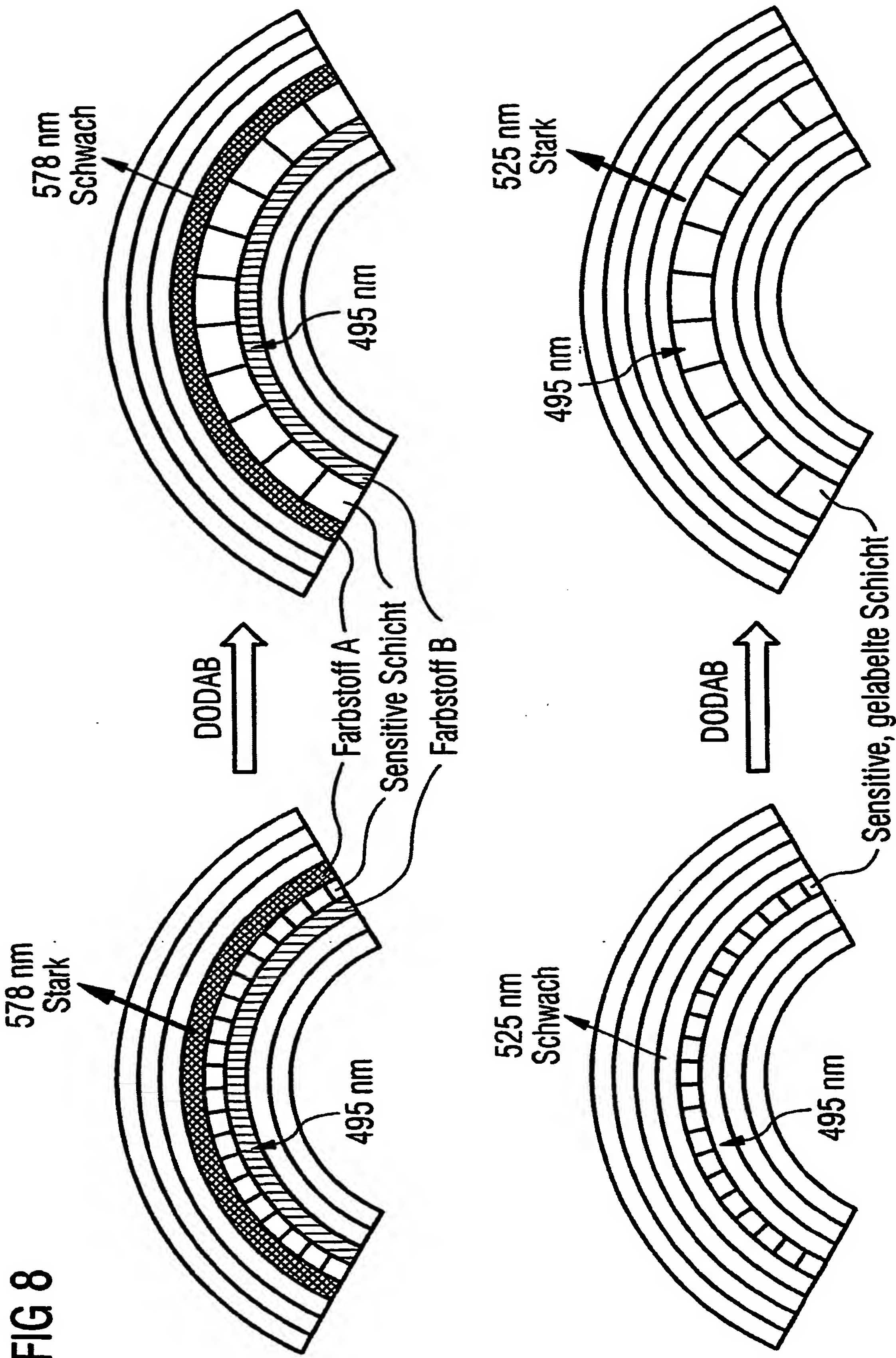


FIG 8

FIG 9

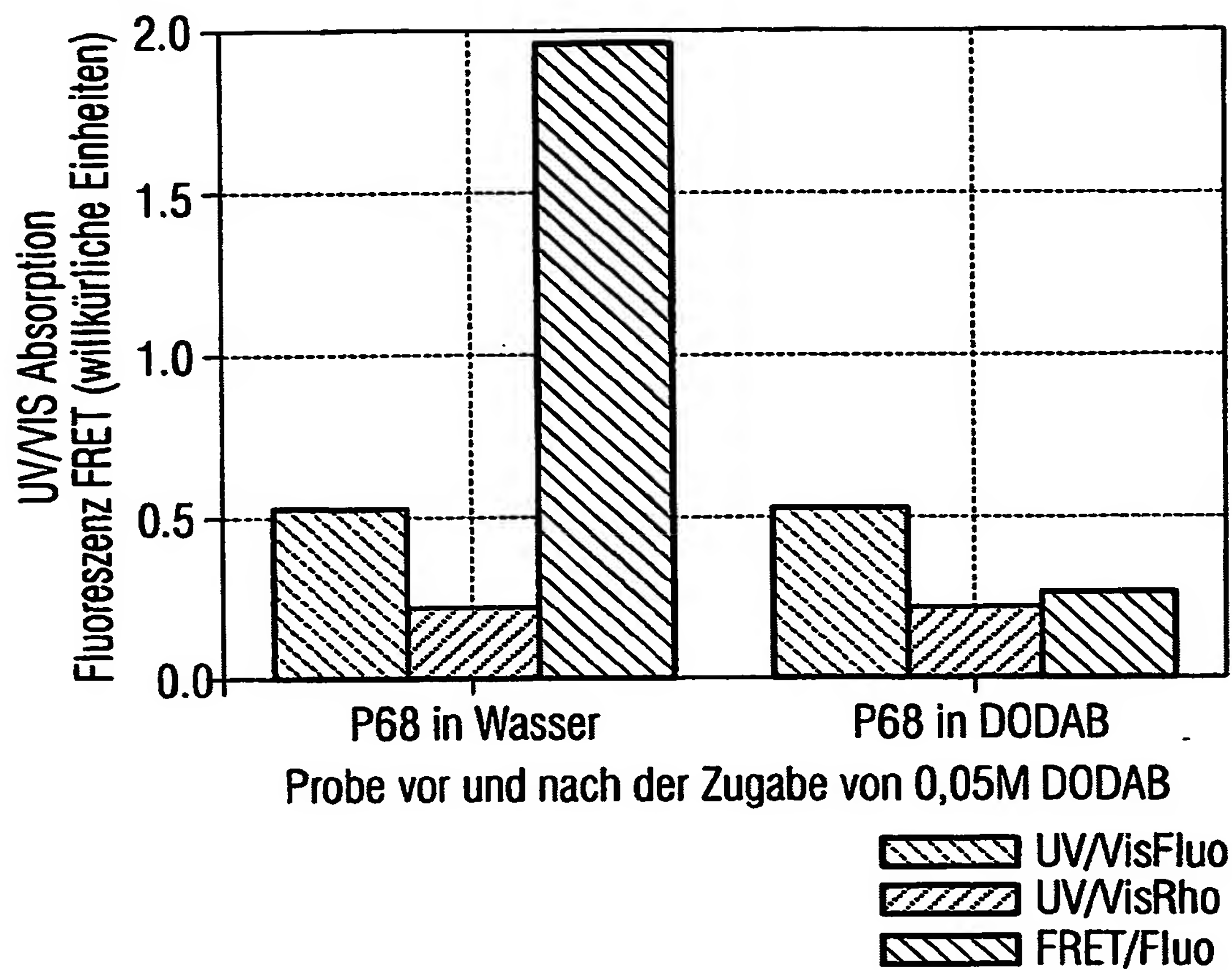
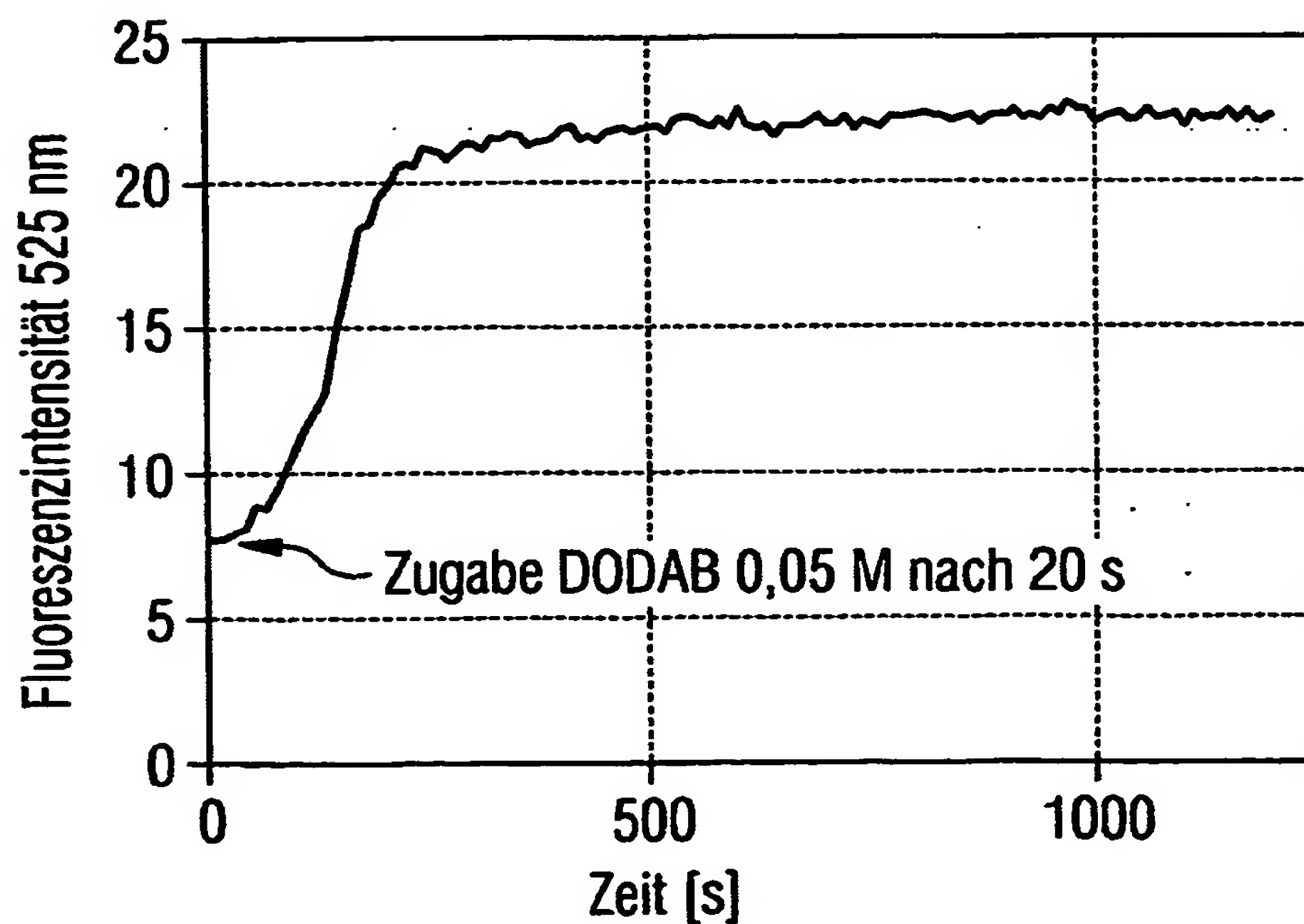


FIG 10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No  
PCT/EP 03/08376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 B01J13/02 B01J13/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | DAI Z ET AL: "LAYER-BY-LAYER<br>SELF-ASSEMBLY OF POLYELECTROLYTE AND LOW<br>MOLECULAR WEIGHT SPECIES INTO CAPSULES"<br>ADVANCED MATERIALS, VCH<br>VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE,<br>vol. 13, no. 17,<br>3 September 2001 (2001-09-03), pages<br>1339-1342, XP001129372<br>ISSN: 0935-9648<br>the whole document | 1-25                  |
| X          | WO 02 17888 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT<br>;DAEHNE LARS (DE); IBARZ GEMMA (DE);<br>ANTIP) 7 March 2002 (2002-03-07)<br>claim 11; examples 1-4  | 1-25                  |
|            | -/--  |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 2003

Date of mailing of the international search report

24/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Willsher, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No  
PCT/EP 03/08376

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | GB 2 135 954 A (AKAD WISSENSCHAFTEN DDR)<br>12 September 1984 (1984-09-12)<br>claims 2,3,9,10; examples 9-12<br>---  | 1-23                  |
| A          | WO 00 32542 A (TRAU MATT ;UNIV QUEENSLAND<br>(AU); BATTERSBY BRONWYN JEAN (AU); BRYA)<br>8 June 2000 (2000-06-08)<br>cited in the application<br>example 14<br>----- | 1-25                  |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/08376

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date |    | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----|----------------------------|---------------------|
| WO 0217888                                | A | 07-03-2002          | CA | 2420523 A1                 | 07-03-2002          |
|   |   |                     | WO | 0217888 A2                 | 07-03-2002          |
|   |   |                     | EP | 1313455 A2                 | 28-05-2003          |
| <hr/>                                     |   |                     |    |                            |                     |
| GB 2135954                                | A | 12-09-1984          | DD | 160393 A3                  | 27-07-1983          |
|   |   |                     | CH | 659591 A5                  | 13-02-1987          |
|   |   |                     | DE | 3306259 A1                 | 23-08-1984          |
| <hr/>                                     |   |                     |    |                            |                     |
| WO 0032542                                | A | 08-06-2000          | AU | 1958600 A                  | 19-06-2000          |
|   |   |                     | WO | 0032542 A1                 | 08-06-2000          |
|   |   |                     | CA | 2352082 A1                 | 08-06-2000          |
|   |   |                     | EP | 1135350 A1                 | 26-09-2001          |
|   |   |                     | JP | 2002531424 T               | 24-09-2002          |
| <hr/>                                     |   |                     |    |                            |                     |

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatlc Aktenzeichen  
PCT/EP 03/08376A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 B01J13/02 B01J13/22

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | DAI Z ET AL: "LAYER-BY-LAYER<br>SELF-ASSEMBLY OF POLYELECTROLYTE AND LOW<br>MOLECULAR WEIGHT SPECIES INTO CAPSULES"<br>ADVANCED MATERIALS, VCH<br>VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE,<br>Bd. 13, Nr. 17,<br>3. September 2001 (2001-09-03), Seiten<br>1339-1342, XP001129372<br>ISSN: 0935-9648<br>das ganze Dokument | 1-25               |
| X          | WO 02 17888 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT<br>;DAEHNE LARS (DE); IBARZ GEMMA (DE);<br>ANTIP) 7. März 2002 (2002-03-07)<br>Anspruch 11; Beispiele 1-4   | 1-25               |
|            | ---<br>-/-   |                    |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/11/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Willsher, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/08376

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN |  |                    |
|--|--|--------------------|
| Kategorie°   | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
| X  | GB 2 135 954 A (AKAD WISSENSCHAFTEN DDR)<br>12. September 1984 (1984-09-12)<br>Ansprüche 2,3,9,10; Beispiele 9-12<br>---   | 1-23               |
| A  | WO 00 32542 A (TRAU MATT ;UNIV QUEENSLAND<br>(AU); BATTERSBY BRONWYN JEAN (AU); BRYA)<br>8. Juni 2000 (2000-06-08)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Beispiel 14<br>----- | 1-25               |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatio      kenzekchen  
PCT/EP 03/08376

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument |   | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie |              | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------------------------|
| WO 0217888   | A | 07-03-2002                    | CA                                | 2420523 A1   | 07-03-2002                    |
|  |   |                               | WO                                | 0217888 A2   | 07-03-2002                    |
|  |   |                               | EP                                | 1313455 A2   | 28-05-2003                    |
| GB 2135954   | A | 12-09-1984                    | DD                                | 160393 A3    | 27-07-1983                    |
|  |   |                               | CH                                | 659591 A5    | 13-02-1987                    |
|  |   |                               | DE                                | 3306259 A1   | 23-08-1984                    |
| WO 0032542   | A | 08-06-2000                    | AU                                | 1958600 A    | 19-06-2000                    |
|  |   |                               | WO                                | 0032542 A1   | 08-06-2000                    |
|  |   |                               | CA                                | 2352082 A1   | 08-06-2000                    |
|  |   |                               | EP                                | 1135350 A1   | 26-09-2001                    |
|  |   |                               | JP                                | 2002531424 T | 24-09-2002                    |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**